



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

FLÁVIA DIAS COELHO DA SILVA

A INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO POR TLR2, TLR4 E TLR9 NA RESPOSTA DE CÉLULAS T REGULADORAS EM CULTURA DE SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis*, DESAFIADAS *IN VITRO* COM O BACILO DE KOCH.

**VITÓRIA
2018**

FLÁVIA DIAS COELHO DA SILVA

A INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO POR TLR2, TLR4 E TLR9 NA RESPOSTA DE CÉLULAS T REGULADORAS EM CULTURA DE SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis*, DESAFIADAS *IN VITRO* COM O BACILO DE KOCH.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Doutor(a) em Doenças Infecciosas.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

VITÓRIA
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S586i Silva, Flávia Dias Coelho da, 1979 -
A influência da modulação por TLR2, TLR4 e TLR9 na resposta de
células T reguladoras em cultura de sangue periférico de indivíduos com
infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, desafiadas in vitro com o
bacilo de Koch / Flávia Dias Coelho da Silva - 2018.
103 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Monócitos. 3. Citocinas.
I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

A doutoranda **Flavia Dias Coêlho da Silva** apresentou a tese intitulada **“INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO DE TLR2, TLR4 E TLR9 NA RESPOSTA DE LINFÓCITOS T REGULADORES EM CULTURAS DE SANGUE PERIFÉRICAS DE INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis*, DESAFIADOS COM A MICOBACTÉRIA”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (☒) **aprovar** (☐) **reprovar** a tese habilitando a Mestre em Doenças Infecciosas **FLAVIA DIAS COÊLHO DA SILVA** a obter o Grau de DOUTOR EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 10 de julho de 2018.

Dr.^a Sandra Lúcia Ventorin Von Zeidler
(Membro Externo)

Dr.^a Johara Boldrini-França
(Membro Externo)

Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)

Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro Interno)

Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Orientador)

Ao meu querido marido Mauro e filhos, Bernardo e Hugo, que tanto me apoiam e não reclamam da minha ausência. Especialmente, ao Mauro, que sempre se priva de seus sonhos e metas em favor dos meus; o meu amor, carinho, admiração e agradecimento eterno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

A Deus pelas bênçãos concedidas, pelos direcionamentos no decorrer deste trabalho e pelas pessoas que colocou em minha vida para a conclusão do mesmo.

Ao meu amado esposo, Mauro Sérgio, pela compreensão, ajuda, apoio, paciência, confiança, companheirismo, dedicação e AMOR, sem os quais eu jamais teria alcançado mais uma meta.

Aos meus filhos, Bernardo e Hugo, pelo amor, paciência nas ausências e sorrisos nos momentos de cansaço.

Ao Professor Rodrigo, pela oportunidade, orientação, confiança e dedicação.

Ao amigo e às amigas, Lorenzo, Naira e Luciana, que foram braços e cabeça durante todo o doutorado. Agradeço pela ajuda e apoio.

À Johara Boldrini-França e aos professores Sandra Lucia Ventorin von Zeidler, Moisés Palaci e Fausto Edmundo Lima Pereira, por terem aceito meu convite, e desta forma, terem contribuído com sugestões e ideias desse trabalho.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas, pelo suporte ao desenvolvimento de nosso projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, em especial à Thamires Vettorazzi de Moura, pela ajuda e esclarecimentos administrativos.

A todos do laboratório de Micobacteriologia, especialmente, ao Ledüç Mageski, pelo apoio técnico.

A CAPES pela bolsa concedida, que permitiu minha dedicação exclusiva à pesquisa durante o período de vigência da bolsa.

A todos os participantes que consentiram a participação no estudo e permitiram a realização dessa tese.

Por fim, muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa tese.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

Resumo

A infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI) afeta aproximadamente um quarto da população mundial. Durante a LTBI, o *M. tuberculosis* (*Mtb*) sobrevive num estado de dormência, que na reativação da infecção latente, este retoma o crescimento e o metabolismo normais. Os macrófagos/monócitos (MO) desempenham um papel central na patogênese micobacteriana, uma vez que são o principal nicho celular para o *Mtb* durante as infecções. A resposta imune protetora, a qual os MO fazem parte é influenciada por mecanismos supressores, entre eles o aumento da atividade das células T reguladoras (Tregs). Tregs têm a capacidade de controlar o dano tecidual ao diminuir o controle adequado da replicação micobacteriana, e também, podem estar envolvidas na reativação e disseminação do *Mtb*. Os receptores *Toll-like* (TLRs) participam da resposta à infecção detectando e regulando-a, sendo os TLR2, TLR4 e TLR9 conhecidos por reconhecer componentes do *Mtb*, o que influencia na resposta, inclusive, na cinética e produção de citocinas pela infecção. Buscou-se com essa pesquisa avaliar a influência dos agonistas e antagonista dos TLR2, TLR4 e TLR9, em sangue periférico e em culturas de sangue total desafiadas com o *Mtb*, de indivíduos com LTBI (grupo TST+) em relação ao controle negativo (grupo TST-), investigando a frequência de células Tregs e MO, a atividade microbicida e a dosagem de citocinas IL10, IL17, TGF β e IFN γ , entre esses grupos. O que se observou foi uma maior frequência de MO (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺), no sangue periférico de indivíduos LTBI/TST+. Na ação de agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9 ou de antagonista de TLR9, sob a frequência de células Tregs de culturas de sangue total desafiadas com *Mtb*, houve maior frequência dessas células no grupo TST+, que foi reduzida após o uso de antagonista de TLR9 (cloroquina). Quanto à influência da infecção por *Mtb* nas culturas, a atividade microbicida foi menor no grupo TST+. Nas culturas infectadas e moduladas com TLRs, houve redução da atividade microbicida no grupo TST+, durante estimulação com agonista de TLR2, e nesses mesmos indivíduos, no estímulo com antagonista de TLR9, observou-se a restauração da atividade microbicida. Quanto à dosagem de citocinas nas mesmas culturas, houve maior produção de IL10, IL17 e IFN γ no grupo TST+, especialmente, após modulação com cloroquina, em relação ao grupo TST-. Em suma, LTBI difere do controle TST- pela maior frequência de Tregs e MO e pela menor atividade microbicida, ao passo que o bloqueio de TLR9, pelo uso da cloroquina, resultou na redução da frequência de células Tregs, na maior produção de IL17, IFN γ e IL10 e na melhora da atividade microbicida de LTBI em relação ao TST-.

Palavras-chave: *Mtb*. LTBI. TLR. Células Treg. Monócitos. Citocinas.

Abstract

Latent tuberculosis infection (LTBI) affects approximately a quarter of the world's population. During LTBI, *M. tuberculosis* (*Mtb*) survives in a state of dormancy, which reactivates latent infection, which resumes normal growth and metabolism. Macrophages / monocytes (MO) play a central role in the mycobacterial pathogenesis, since they are the main cellular niche for *Mtb* during infections. The protective immune response, which the MO are part of is influenced by suppressive mechanisms, among them the increase of the activity of T regulatory cells (Tregs). Tregs have the ability to control tissue damage by decreasing adequate control of mycobacterial replication, and may also be involved in the reactivation and dissemination of *Mtb*. Toll-like receptors (TLRs) participate in the response to the infection by detecting and regulating it, and TLR2, TLR4 and TLR9 are known to recognize components of *Mtb*, which influence the response to kinetics and cytokine production by infection. We sought to assess the influence of TLR2, TLR4 and TLR9 agonists and antagonist in peripheral blood and *Mtb*-challenged whole blood cultures of individuals with LTBI (TST+ group) relative to the negative control (TST- group), investigating the frequency of Tregs and MO cells, the microbicidal activity and the dosage of cytokine IL10, IL17, TGF β and IFN γ among these groups. Higher frequency of MO (CD14⁺ CD16⁺ HLA-DR⁺, CD14⁺ TLR2⁺ HLA-DR⁺, CD14⁺ TLR4⁺ HLA-DR⁺, CD14⁺ TLR9⁺ HLA-DR⁺) was observed in the peripheral blood of LTBI/TST+ individuals. In the action of TLR2, TLR4 and TLR9 agonists or of TLR9 antagonist, under the frequency of Tregs cells from *Mtb*-challenged whole blood cultures, there was a higher frequency of these cells in the TST+ group, which was reduced after the use of TLR9 antagonist (chloroquine). As regards the influence of *Mtb* infection on the cultures, the microbicidal activity was lower in the TST+ group. In cultures infected with *Mtb* and TLRs-modulated, there was a reduction of the microbicidal activity in the TST+ group, during stimulation with TLR2 agonist, and, in the same individuals, in the stimulus with TLR9 antagonist, it was observed the restoration of the microbicidal activity. As for the dosage of cytokine in the same cultures, there was a higher production of IL10, IL17 and IFN γ in the TST+ group, especially after modulation with chloroquine, compared to the TST- group. In summary, LTBI differs from the control TST- by the higher frequency of Tregs and MO and the lower microbicidal activity, whereas the TLR9 blockade, by the use of chloroquine, resulted in the reduction of Treg cell frequency, in the higher production of IL17, IFN γ and IL10 and in the improvement of the microbicidal activity of LTBI in relation to TST-.

Keywords: *Mtb*. LTBI. TLR. Treg cells. Monocytes. Cytokines.

Índice de Figuras

Figura 1: Reconhecimento de <i>Mtb</i> na resposta inata. O <i>Mtb</i> infecta principalmente células imunes inatas, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células assassinas naturais.	21
Figura 1: Interação e ação de TLRs aos componentes do <i>Mtb</i>	25
Figura 3: Esquema representativo das coletas e grupos formados em cada etapa da pesquisa. Em cada etapa foram realizados novos arrolamentos e coletas.....	38
Figura 4: Esquema representativo das coletas e técnicas em cada etapa da pesquisa. Este esquema resume os métodos empregados para a obtenção dos resultados.....	39
Figura 5: Gráficos de distribuição pontual exemplificando a análise de marcadores que definiram os fenótipos monócitos/macrófagos. A) Gráfico de distribuição pontual SSC (side scatter) versus HLA-DR PEcy5 para definição das regiões de análise monócitos/macrófagos, gate R1. B) Gráfico de distribuição pontual entre os marcadores CD14 FITC e x PE, para obtenção da subpopulação CD14+x+HLA-DR+ (retângulo superior direito do quadrante)	42
Figura 6: Gráficos de distribuição pontual exemplificando a análise de marcadores que definiram os fenótipos dos linfócitos T reguladores. A) Gráfico de distribuição pontual SSC (side scatter) versus CD4 FITC e seleção de linfócitos T CD4+, gate R2. A partir deste gate o histograma para células CD127 foi construído e selecionamos a população CD127-. Com base nela o próximo gráfico foi montado. B) Gráfico de distribuição pontual entre os marcadores CD25 PEcy7 e FoxP3 PE, para obtenção da subpopulação T reguladoras; CD4+CD25+CD127-FoxP3+ (retângulo superior direito do quadrante)....	43
Figura 7: Análise de marcadores de ativação/coestimulação (CD16 ⁺ , TLR2 ⁺ , TLR4 ⁺ e TLR9 ⁺ - conjugados com PE) em Monócitos/macrófagos CD14 ⁺ FITC HLA-DR ⁺ PEcy5. Identificação em sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=24); TST- (n=5) e TST+ (n=15). A) Células CD14 ⁺ TLR2 ⁺ HLA-DR ⁺ ; B) Células CD14 ⁺ TLR4 ⁺ HLA-DR ⁺ ; C) Células CD14 ⁺ TLR9 ⁺ HLA-DR ⁺ ; D) Células CD14 ⁺ CD16 ⁺ HLA-DR ⁺ . As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. Os valores de *p≤0,05 foram estatisticamente significantes.....	51
Figura 8: Correlação de Pearson (r): correlação entre células monocíticas CD14+HLA-DR+ expressando os marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 e os resultados do teste tuberculínico (enduração em mm). TST+ baixa resposta (BR) foram indivíduos que resultados de enduração entre 10 e 15 mm. TST+ alta resposta (AR) foram pessoas que enduração igual ou superior a 15 mm. Os valores de r presentes no gráfico apresentam significância estatística (p≤0,05)	52
Figura 9: Análise de marcadores de ativação/coestimulação (CD16 ⁺ , TLR2 ⁺ , TLR4 ⁺ e TLR9 ⁺ - conjugados com PE) em Monócitos/macrófagos CD14+FITC HLA-DR+PEcy5. Identificação em sangue periférico de indivíduos com TB pulmonar – TB (n=24), TST- (n=5), TST+ BR (n=6) e TST+ AR (n=9). As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. Os valores de *p≤0,05 e ** p<0,0001 foram estatisticamente significantes.....	53

Figura 10: Atividade microbicida em indivíduos TST- e TST+. Desafio *in vitro* com a cepa de *Mtb* H37Rv por 72h de incubação. Quanto menor o quantitativo de unidades formadoras de colônias maior a atividade microbicida. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos * $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.....54

Figura 11: Análise dos marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 em monócitos/macrófagos de indivíduos TST- e TST+. A) Fenotipagem em sangue periférico fresco; B) Fenotipagem em células da cultura de sangue total, infectada *in vitro* com a cepa de *Mtb* H37Rv. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos Valores de * $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.....55

Figura 12: Correlação de Pearson (r): correlação entre células monocíticas CD14+HLA-DR+ expressando os marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 e os resultados do teste tuberculínico (enduração em mm) em cultura de sangue total infectada ou não com *Mtb*. A) Cultura sangue total não infectada do grupo TST-; B) Cultura sangue total não infectada do grupo TST+; C) Cultura sangue total infectada do grupo TST-; D) Cultura sangue total infectada do grupo TST+. TST- (n=3) e TST+ (n=3). TST- (enduração < 5 mm) e TST+ (enduração ≥ 15 mm). Os valores de r presentes no gráfico apresentam significância estatística ($p \leq 0,05$)56

Figura 23: Análise da atividade microbicida nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb*, na presença ou ausência de agonistas de TLR2, TLR4, TLR9 e antagonista de TLR9. Análise intragrupos: A) Unidade Formadora de Colônia (UFC) da cepa *Mtb* H37Rv no grupo TST- (n=9); B) UFC da cepa H37Rv no grupo TST+ (n=10). C) Unidades Formadoras de Colônia na análise intergrupos. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. † Todas as condições de estimulação apresentam infecção por *Mtb*. *Os valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significantes.....57

Figura 14: Análise fenotípica de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb*, na presença ou ausência de agonistas de TLR2, TLR4, TLR9 e antagonista de TLR9. Análise intragrupos: A) Grupo TST- (n=9); B) Grupo TST+ (n=10). C) Análise intergrupos. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. † Todas as condições de estimulação apresentam infecção por *Mtb*. * Os valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significantes.....59

Figura 15: Dosagem de citocinas TGF β , IL10, IL17 e IFN γ (pg/ml) nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb*, na presença ou ausência de agonistas de TLR2, TLR4, TLR9 e antagonista de TLR9. Análises intra e intergrupos – grupo TST- (n=9) e grupo TST+ (n=10). A) Análise i TGF β ; B) IL10; C) IL17 e D) IFN γ . As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. Todas as condições de estimulação (agonistas e antagonista) apresentam infecção por *Mtb*. * Os valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente significantes.....61

Índice de Tabelas e Quadros

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de linfócitos T reguladores, monócitos e controles isotípicos.....**41**

Tabela 2: Concentração dos agonistas e antagonista de TLR2, TLR4 e TLR9 utilizados na estimulação das culturas de sangue total.....**46**

Quadro 1: Critérios para a positividade de TST, por grupo de riscos.....**100**

Quadro 2: Anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de células T reguladoras e monócitos/macrófagos.....**101**

Lista de Siglas

APC - Células apresentadoras de antígenos
ATCC - American Type Culture Collection
BCG - *Bacilo Calmette Guérin*
BSA - *Bovine serum albumin*
CCI - Controle de crescimento do inóculo
CD - *Cluster of differentiation*
CHO - *Chinese hamster ovary*
CLRs - *C-type lectin receptors*
CpG - Dinucleotídeo não metilado
CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*
DC - Células dendríticas
DO - Densidade óptica
DNA - *Deoxyribonucleic acid*
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ESAT6 - 6 kDa early secretory antigenic target
ESX1 - *ESAT-6 Secretion System-1*
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3 - *Forkhead transcription factor 3*
FSC - *Foward Scatter*
G-CSF - *Granulocyte-Colony Stimulating Fator*
HCl - Ácido clorídrico
HIV - *Human immunodeficiency virus*
HRP - Enzima Avidina-Horseradish peroxidase
HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes
ICOS - *Inducible T-cell Costimulator*
ICOS L - *Inducible T-cell Costimulator ligand*
iTreg - Células T reguladoras induzidas
IFN - *Interferon*
IGRAs - *Interferon-Gamma Release Assays*
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
iNOS - *Inducible Nitric Oxide Synthase*
LM - Lipomanana
LPS - Lipopolissacarídeo
LTBI - Infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*
ManLAM - Lipoarabinomanana encapsulada com manose
MD2 - *Myeloid differentiation protein 2*
MOI - *Multiplicity of infection*
mRNA - *Messenger ribonucleic acid*
MyD88 - *Myeloid Differentiation primary response 88*
Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
NaOH - Hidróxido de sódio
NOD2 - *Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*
NF-κB - *Factor Nuclear Kappa B*
NK - Células *Natural Killer*
NO - Óxido nítrico
NLR - *Nod-like receptor*
nTreg - Células T reguladoras naturais
OADC - *Oleic Albumin Dextrose Catalase*

PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

Pam3CSK4 - Pam3CysSerLys4, lipopeptídio tri-palmitoilado sintético

PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (Células mononucleares sangue periférico)

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PD-1 - *Programmed death 1*

PE - *Phycoerythrin*

PE-Cy5 - *Phycoerythrin and a cyanine dye*

PPD - *Purified Protein Derivative*

ROI - *Reactive oxygen intermediates*

ROR γ t - *RAR-related orphan receptor gamma t*

RNI - *Reactive nitrogen intermediates*

SSC - *Side Scatter*

STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription-3*

TB - *Tuberculose*

Teffs - Células T efetoras

TGF - *Transforming growth factor*

Th - Célula T helper

TLR - *Toll-like receptor*

TNF - *Tumor Necrosis Factor*

Tregs - Células T reguladoras

TST - *Tuberculin skin test*

WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 HIPÓTESE	34
3 OBJETIVOS	35
4 MÉTODOS	36
4.1 MODELO DO ESTUDO	36
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	36
4.3 PACIENTES E INDIVÍDUOS CONTROLES	36
4.4 BACILOSCOPIA E CULTURA	38
4.5 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO	38
4.5.1 QUANTIFICAÇÃO E FENOTIPAGEM DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS E CÉLULAS T REGULADORAS	39
4.6 SELEÇÃO, PREPARO E QUANTIFICAÇÃO DO ISOLADO DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	43
4.7 ENSAIOS DA ATIVIDADE DOS RECEPTORES TIPO <i>TOLL</i>. PREPARO DO SANGUE TOTAL - MODULAÇÃO DO SINAL DE TLR2, TLR4 E TLR9	45
4.7.1 INFECÇÃO DO SANGUE TOTAL <i>IN VITRO</i> COM <i>M. TUBERCULOSIS</i>	46
4.7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA EM CULTURA DE SANGUE TOTAL	47
4.7.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	47
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5 RESULTADOS	50
5.1 DEFINIÇÃO DOS NOSSOS CASOS DE INFECÇÃO TB LATENTE (LTBI)	50
5.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO	50
5.1.2. FREQUÊNCIA E FENÓTIPO DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS EM SANGUE PERIFÉRICO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INFECÇÃO PELO <i>MTB</i>	50
5.2 ANÁLISE DOS CASOS DE INFECÇÃO TB LATENTE	53
5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO	53
5.2.2. ATIVIDADE MICROBICIDA DOS INDIVÍDUOS TST- E TST+ EM CULTURAS DE SANGUE TOTAL.	54
5.2.3 FREQUÊNCIA DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO: <i>EX VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	55
5.2.3 ATIVIDADE MICROBICIDA EM CULTURAS DE SANGUE TOTAL APÓS MODULAÇÃO DOS TLRs.	57
5.2.4 FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULADORAS NA CULTURA DE SANGUE TOTAL APÓS MODULAÇÃO DE TLR2, TLR4 E TLR9 E INFECÇÃO COM <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV	58
5.2.5 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DE CULTURA INFECTADAS COM <i>MTB</i> APÓS MODULAÇÃO COM TLRs	59
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	75

8 REFERÊNCIAS	<u>77</u>
----------------------	------------------

ANEXOS	<u>99</u>
---------------	------------------

1 INTRODUÇÃO

A infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI) afeta aproximadamente um quarto da população mundial (HOUBEN; DODD, 2016) sendo caracterizada pela ausência de evidências de Tuberculose (TB), incluindo a falta de sinais ou sintomas clínicos e com presença de radiografia de tórax normal (ZENNER et al., 2017). Embora os pacientes sejam classificados como tendo infecção latente ou TB, para fins de manejo clínico, o espectro de infecção por *M. tuberculosis* (*Mtb*) é melhor descrito como um processo dinâmico e contínuo entre exposição, infecção e doença do que como um processo binário (BARRY et al., 2009; ESMAIL; BARRY; WILKINSON, 2012; PAI et al., 2016).

Após a exposição inicial, as micobactérias podem: a) ser totalmente eliminadas pela resposta imune inata do hospedeiro; b) progredir rapidamente para a Tuberculose primária, ou c) ser parcialmente contidas em um estado de doença semidormente, que pode incluir períodos de doença subclínica com replicação micobacteriana não detectada, LTBI (ZENNER et al., 2017).

A infecção pelo *Mtb* só pode ser detectada indiretamente, através da avaliação da resposta imune a sensibilidade as proteínas micobacterianas com o teste tuberculínico (TST) ou teste de liberação de interferon (*IGRA*). No entanto, esses testes não são capazes de distinguir pessoas cujo sistema imunológico pode ter eliminado completamente a infecção daqueles que continuam infectados e em risco de reativar a doença no futuro (BARRY et al., 2009; ESMAIL; BARRY; WILKINSON, 2012; LEWINSOHN et al., 2017).

A probabilidade de progressão para a Tuberculose primária ou reativação da LTBI varia com base nas características da pessoa infectada (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; MARKOWITZ, 1997; PAI et al., 2016; ZENNER et al., 2017) No entanto, esse risco de progressão para a TB ativa pode ser significativamente reduzido pelo tratamento com drogas antimicobacterianas durante a infecção latente, sendo demonstrado um maior benefício entre indivíduos de alto risco (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; GETAHUN et al., 2015; KAHWATI et al., 2016; ZENNER et al., 2017). De acordo com estudos históricos, existe uma modesta associação positiva entre a reatividade

tuberculínica e o risco de TB (PAI et al., 2014). Com base nesses estudos, muitos indivíduos TST positivos precisam ser diagnosticados e tratados para prevenir a progressão para a doença ativa (depende do grupo de risco a qual pertençam – quadro 1; página 100). Assim, o teste tem sido empregado em grupos de alto risco como uma prática comum (GETAHUN et al., 2015; PAI et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015)

A maioria das pessoas com infecção primária é capaz de controlar a infecção e pode não apresentar doença clínica, por isso alguns autores sugerem que a latência e a doença ativa são os extremos de um espectro (BARRY et al., 2009). Estudos epidemiológicos indicam que há uma chance de 5% a 10% de que a infecção controlada ou latente se torne manifesta/evidente para produzir doença pós-primária (LIPWORTH et al., 2016). Acredita-se que esta seja a via mais frequente para a TB pulmonar (HARRIES; DYE, 2006). Estudar a contenção bem-sucedida durante a LTBI e sua falha durante a reativação pode, portanto, levar a vacinas melhor direcionadas (VEATCH; KAUSHAL, 2018).

Durante a LTBI, acredita-se que o *Mtb* sobreviva num estado de dormência (LIPWORTH et al., 2016). A dormência é definida como um fenótipo dos bacilos, enquanto a latência é uma definição clínica (VEATCH; KAUSHAL, 2018). Durante a reativação da LTBI, acredita-se que os bacilos dormentes ressuscitem e retomem o crescimento e o metabolismo normais. A ressuscitação é a recuperação da dormência e é um fenótipo dos bacilos, e reativação é o termo clínico para a recorrência da doença após a latência (LIPWORTH et al., 2016; VEATCH; KAUSHAL, 2018).

Nossa capacidade de estudar e gerenciar a forma latente da doença foi transformada por métodos diagnósticos aprimorados, dependendo de ensaios específicos de resposta de células T à TB ou de *IGRAs*, que para alguns, são superiores aos testes cutâneos de TB (DIEL; LODDENKEMPER; NIENHAUS, 2012). A importância da infecção latente na história natural da TB muitas vezes levou a uma ligação potencialmente falsa em relação as considerações bacteriológicas de dormência. A suposição é que as células micobacterianas na infecção latente estão dormentes. No entanto, há pouca evidência experimental para apoiar essa hipótese (LIPWORTH et al., 2016).

Pacientes com infecção latente podem ser tratados com sucesso com isoniazida, uma droga que inibe a síntese da parede celular (LIPWORTH et al., 2016). As observações das células dependentes de fator de promoção de ressuscitação, que mostram atividade metabólica reduzida, vão de alguma forma criar uma ponte entre os conceitos de dormência e latência (GARTON et al., 2008; MUKAMOLOVA et al., 2010). Detecção pela PCR de *Mtb* obtida em secções de amostras de tecido adiposo de 39 indivíduos do México e da França que morreram de causas diferentes de TB. O DNA de *Mtb* foi detectado em tecido adiposo ao redor dos rins, do estômago, dos gânglios linfáticos, do coração e da pele em 9/57 amostras mexicanas (6/19 indivíduos) e em 8/26 amostras francesas (6/20 indivíduos) (NEYROLLES et al., 2006). Outros estudos *post mortem* relataram resultados semelhantes (HERNÁNDEZ-PANDO et al., 2000). Um estudo subsequente identificou bacilos viáveis em locais extrapulmonares, como evidenciado pela detecção de mRNA micobacteriano (BARRIOS-PAYÁN et al., 2012). Mais trabalhos são necessários usando métodos baseados em RNA para confirmar o nível de atividade das células bacterianas no tecido (LIPWORTH et al., 2016). Essa compreensão se faz necessária, pois se pudermos interromper a transição da LTBI não-contagiosa para a TB infecciosa, a cadeia de transmissão pode ser quebrada (VEATCH; KAUSHAL, 2018).

Os macrófagos/monócitos desempenham um papel central na patogênese micobacteriana, uma vez que são o principal nicho celular para o *Mtb* durante infecções precoces e crônicas (MCCLEAN; TOBIN, 2016). Os macrófagos podem eliminar o *Mtb* através de múltiplos mecanismos, incluindo a produção de oxigênio e nitrogênio e citocinas, a acidificação de fagossomos, entre outros processos (LIU; LIU; GE, 2017). O *Mtb* é fagocitado pelos macrófagos alveolares, que são as primeiras células a encontrar o patógeno e recrutam diferentes tipos de macrófagos, como macrófagos derivados de monócitos, durante a infecção inicial (CADENA; FLYNN; FORTUNE, 2016). O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de *Mtb* (como glicolipídeos, lipoproteínas e carboidratos) por receptores de macrófagos (como TLRs, NLRs e CLRs) induz uma rede de vias de sinalização coordenadas que levam a perfis distintos de expressão gênica em macrófagos em diferentes estágios da infecção (KILLICK et al., 2013). Estudos de perfis de

genes forneceram evidências para a importância de citocinas inflamatórias, incluindo IFN- γ , IL12, IL1 β e MIP-1 α / CCL3 na defesa contra infecção por *Mtb* (CAPPELLI et al., 2001). O desenvolvimento e a função dos macrófagos são moldados por sinais microambientais, que impulsionam para a sua diferenciação (LIU; LIU; GE, 2017), podendo ser dividido em subgrupos com base no marcador CD16.

CD16 (Fc γ RIII) é um dos receptores Fc da imunoglobulina G (IgG) (Fc γ Rs) (HARGREAVES et al., 2015). É um Fc γ R ativador que transmite sinais de acionamento através de um motivo de ativação baseado na tirosina do imunoreceptor contido na região citoplasmática, que medeia endocitose e fagocitose de complexos imunes, incluindo microrganismos revestidos de anticorpos (GUILLIAMS et al., 2014). Em ambos, camundongos e seres humanos, subconjuntos de monócitos do sangue exibem expressão superficial diferencial de vários Fc γ Rs.

Nas últimas duas décadas, o CD16 distingue os monócitos humanos em dois subconjuntos principais (subconjuntos CD16 $^{+}$ e CD16 $^{-}$)(ZHU et al., 2016). Subsequentemente, foi descrito o terceiro subconjunto distinto de monócitos dirigido a monócitos CD16 $^{+}$, que foi definido com níveis relativamente mais elevados de CD14 acoplados com menor expressão de CD16. Portanto, os monócitos periféricos humanos podem ser categorizados em três subconjuntos: os monócitos não clássicos (NCM, CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$), os monócitos intermediários (IM, CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$) e os monócitos clássicos (CM, CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$). NCM e IM são abordados coletivamente como monócitos CD16 $^{+}$ (WONG et al., 2012; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

Os monócitos CD16 $^{+}$ são considerados pró-inflamatórios, pois são melhores que os monócitos CD16 $^{-}$ na produção de citocinas TNF α , interleucina IL6 e IL10 em resposta a padrões moleculares associados a microrganismos (LIU; LIU; GE, 2017). Os resultados acumulados nas últimas décadas sugerem que esse subconjunto CD16 $^{+}$ é expandido em muitos tipos diferentes de doenças, principalmente sob infecção ou condições inflamatórias (ZHU et al., 2016). Balboa e colaboradores demonstraram que os monócitos humanos CD16 $^{+}$ se expandem preferencialmente em pacientes com TB, se correlacionam com a

gravidade da doença e são refratários à diferenciação de células dendríticas (BALBOA et al., 2015).

As principais células imunes do hospedeiro, receptores de reconhecimento de padrões e funções celulares envolvidas na defesa imunológica inata contra o *Mtb* estão representados na fig1.

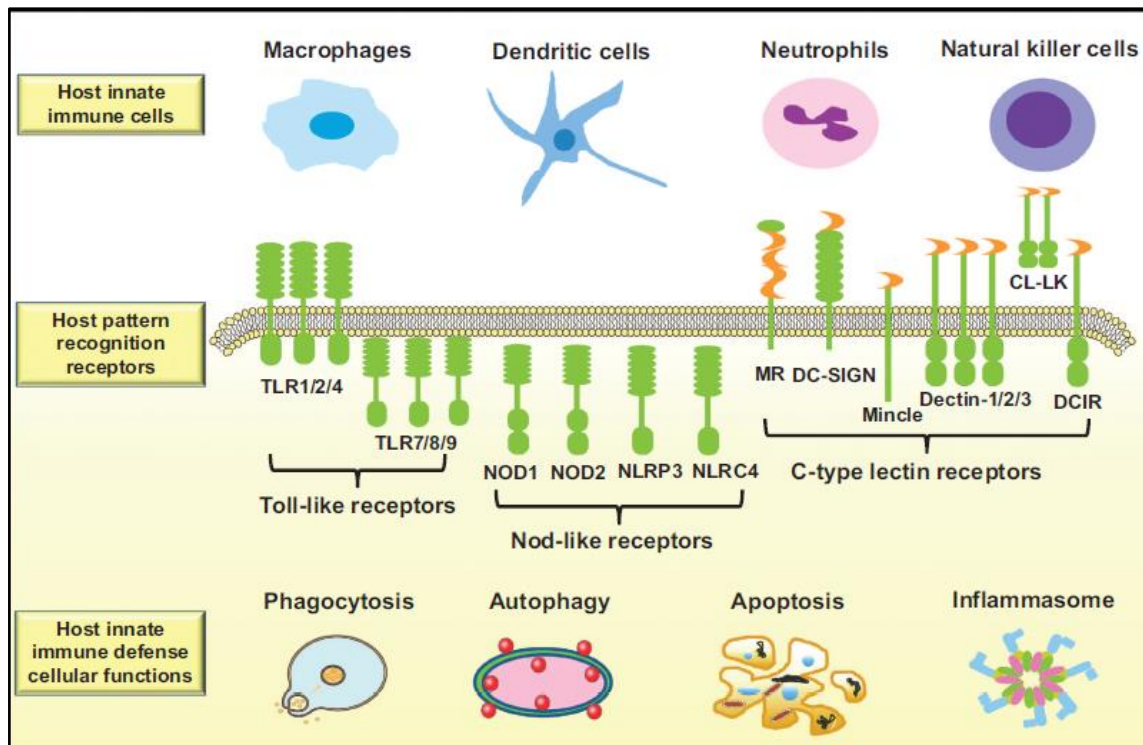


Figura 1 - O *Mtb* infecta principalmente células imunes inatas, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células assassinas naturais. Essas células imunes reconhecem o *Mtb* através de vários receptores de reconhecimento de padrões, incluindo receptores *Toll-like* (como TLR1, TLR2, TLR4, TLR8 e TLR9), receptores tipo *NOD* (como NOD1, NOD2, NLRP3 e NLRC4) e C- tipo receptores de lectina (como MR, DC-SIGN, Mincle, Dectina-1 e Dectina-2, Dectina-3, CL-LK e DCIR). Durante a infecção por *Mtb*, o hospedeiro orchestra a sinalização daqueles PRRs e direciona para uma variedade de funções celulares, tais como fagocitose, autofagia, apoptose e ativação do inflamassoma, para controlar ou eliminar o *Mtb*. Fonte: (LIU; LIU; GE, 2017).

A LTBI tem um espectro amplo e dinâmico, sendo caracterizada por interações patógeno-hospedeiro que variam com o tempo e microambiente tecidual (BARRY et al., 2009) (GIDEON et al., 2015). A replicação ativa do *Mtb* restringida por respostas imunes em camundongos cronicamente infectados, mimetiza o que provavelmente ocorre na LTBI humana (GILL et al., 2009). Além disso, estudos em seres humanos sugerem que a LTBI está associada ao aumento dos marcadores de ativação de células T (WERGELAND; ASSMUS; DYRHOL-RIISE, 2011)(SULLIVAN et al., 2015).

Com base em modelos murinos, a imunidade ao *Mtb* requer respostas *T helper* 1 (Th1) e (em menor medida) respostas Th17. Assim, interleucina (IL) 12, (interferon gama (IFN- γ) e TNF- α (e, IL17 e IL23) desempenham papel importante na indução e manutenção de resposta imune protetora contra a TB (KAUFMANN, 2001; KHADER; COOPER, 2008; NORTH; JUNG, 2004). Além disso, vários fatores reguladores, incluindo células T reguladoras (Tregs), IL10, *transforming growth factor beta* (TGF β), *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) e *programmed death 1* (PD-1), estão também associados a esse tipo de infecção bacteriana (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; LI; FLAVELL, 2008; SAKAGUCHI, 2004)

Na LTBI, a latência é mantida por um equilíbrio entre a persistência do patógeno e a resposta imune, perpetuando o risco de reativação (MARIN et al., 2010), caso a resposta imune do hospedeiro não consiga manter o controle sobre a replicação do bacilo (CHAN; FLYNN, 2004). Essa resposta é influenciada por mecanismos supressores, entre eles o aumento da atividade das células Tregs (BABU et al., 2010; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006). Essas células são recrutadas para órgãos infectados para regular a resposta imune contra a infecção por *Mtb*, pela supressão da função de células T CD4+ antígeno-específicas e na ação de células apresentadoras de antígeno (CHEN et al., 2007; MARIN et al., 2010; SCOTT-BROWNE et al., 2007) Assim, Tregs tem a capacidade de controlar o dano tecidual ao diminuir o controle adequado da replicação micobacteriana, permitindo a persistência e o estabelecimento de uma infecção crônica, porém quando presentes em grande concentração podem estar envolvidas na reativação e disseminação do *Mtb* (MARIN et al., 2010).

Dados sugerem que Tregs podem estar envolvidas na resposta imune contra o *Mtb*. Tregs são encontradas em maior frequência em amostras de sangue periférico de pacientes com TB e associadas com a diminuição da resposta efetora (CHEN et al., 2007; GUYOT-REVOL et al., 2006; HOUGARDY et al., 2007; MARIN et al., 2010). Sendo assim, o repertório de células T periféricas consiste em células T autorreativas e de uma maioria de células T específicas para antígenos derivados de patógenos. Embora a inibição de células autorreativas por células Tregs seja claramente benéfica, a supressão de células

T específicas para agentes patogênicos pode prejudicar a imunidade protetora efetiva contra infecções microbianas (PASARE; MEDZHITOV, 2003).

Como a infecção microbiana é primeiramente detectada e subsequentemente regulada por *Toll-like receptors* (TLRs) (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; MEDZHITOV, 2001), a atividade supressora das células Tregs também pode ser regulada pelos próprios TLRs (PASARE; MEDZHITOV, 2003). Uma significativa indicação de que a sinalização por TLR pode ter um papel importante na manutenção e/ou função de Tregs foi a redução observada na frequência de células Tregs naturais (células T CD4⁺CD25⁺); mas não em células T CD25⁻, em camundongos *knockout* para *Myeloid Differentiation primary response 88* (MyD88), uma molécula adaptadora chave para a sinalização da maioria dos receptores TLRs (SUTMULLER, 2006). Além disso, o *ribonucleic acid* (RNA) mensageiro para uma gama de TLRs foi identificado em Tregs CD4⁺CD25⁺ de ratos, camundongos e humanos (CARAMALHO et al., 2003; CHIFFOLEAU et al., 2006; CRELLIN et al., 2005; LAROSA et al., 2007; PENG et al., 2005; SUTMULLER, 2006) .

As células imunes inatas, as vias de sinalização e as funções celulares que estão envolvidas nas fases iniciais da infecção por *Mtb* são cruciais para limitar a doença e servem também como reguladores potentes da imunidade adaptativa antígeno-específica. (LIU; LIU; GE, 2017). O primeiro passo na ativação da resposta imune inata durante a infecção por *Mtb* começa com o reconhecimento do patógeno (LIU; LIU; GE, 2017). Durante a fagocitose, os PAMPs conservados na superfície do *Mtb* são reconhecidos pelos PRRs nas células hospedeiras (LIU; LIU; GE, 2017). Uma variedade de PRRs reconhecem PAMPs micobacterianos, tais como TLRs, *Nod-like receptors* (NLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), receptores *scavenger*, receptores CD14, AIM2 e AhR (BOWDISH et al., 2009; COURT et al., 2010; SAIGA et al., 2012). Diferentes células imunes inatas usam receptores distintos ou combinações de receptores para identificar e fagocitar o *Mtb*, embora o patógeno possa preferencialmente ter como alvo receptores específicos para manipular as respostas imunes do hospedeiro e promover sua própria sobrevivência intracelular (KILLICK et al., 2013; MORTAZ et al., 2015).

Além de estimular a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, o reconhecimento de patógenos por células inatas desencadeia uma cascata de

eventos celulares, como fagocitose, autofagia, apoptose e ativação do inflamassoma, para controlar ou eliminar patógenos invasores e aumentar a apresentação de antígenos, contribuindo para a indução da imunidade adaptativa (KHAN et al., 2016; KORBEL; SCHNEIDER; SCHAIBLE, 2008). Foi demonstrado que a PPE57, que desempenha um papel na fagocitose de macrófagos, é capaz de reconhecer TLR2 e induzir a ativação de macrófagos, aumentando a expressão de várias moléculas de superfície celular (CD40, CD80, CD86 e MHC classe II) e citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-12p40) em macrófagos (LIU; LIU; GE, 2017). Os TLRs também são importantes para desencadear a apoptose em células infectadas por *Mtb*. Por exemplo, a lipoproteína de 19 kDa de *Mtb* (LpqH), que induz a morte celular de macrófagos de maneira dependente de TLR2 (SÁNCHEZ et al., 2012). Já o estudo com o complexo de PE / PPE PE9 / PE10 demonstrou indução de apoptose em macrófagos via acoplamento de TLR4 (TIWARI; RAMAKRISHNAN; RAGHUNAND, 2015). Durante a infecção por *Mtb*, múltiplos componentes do bacilo interferem (ativam ou inibem) nas funções celulares do hospedeiro (como fagocitose, autofagia, apoptose e ativação do inflamassoma) para ajudar o patógeno a escapar ou contornar a imunidade inata do hospedeiro (LIU; LIU; GE, 2017).

Os TLRs, um tipo de receptor para identificação desse bacilo, reconhecem PAMPs através de repetições ricas em leucina em seus domínios extracelulares, aos quais estão envolvidos na ligação do ligante e na autorregulação (KAWAI; AKIRA, 2006). TLRs são glicoproteínas de membrana, altamente conservadas entre as espécies, capazes de reconhecer lipídeos, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos de vírus e bactérias (HORNUNG et al., 2002; MEDZHITOV, 2007; TRINCHIERI; SHER, 2007). Estes receptores fazem a ligação entre imunidade inata e imunidade adaptativa por ação em células dendríticas - *dendritic cells* (DCs), macrófagos, células T, entre outras células (BHATT; SALGAME, 2007; PARKER; PRINCE; SABROE, 2007).

Os TLRs conhecidos por estarem envolvidos no reconhecimento do *Mtb* são TLR2, TLR4, TLR9 e possivelmente TLR8 (BAFICA et al., 2005; MEANS et al., 1999, 2001). Componentes diferentes da *Mtb* estimulam o sistema imunológico através de receptores TLRs. O papel de cada TLR é representado na figura

TLR2

- Ag-specific memory T cell expansion
- MMP-9 Induction
- Manipulating of MyD88, MAPK, NFkB Signaling Pathways
- Th1 Activation
- Th1 Response
- DCs Activation
- Rv0577
- Rv3628
- MPT83
- Rv1808
- Acylated Lipoprotein
- Regulatory Protection
- LprG
- LpqH
- Peptidoglycan
- NK Activation
- IFN-γ Production
- Macrophage Activation
- Mycolic acid
- ESAT-6
- Macrophage Apoptosis
- Macrophage stimulation
- Cytokine secretion
- Maintenance of Mtb in latent Phase
- Rv2660c

TLR4

- Acylated LM
- HSP 60,65
- 50S ribosomal protein
- Immune cells Activation
- Chaperonin 60
- Phosphatidylinositol mannoside
- inhibiting of TLR-4, Nitric oxide and inflammatory cytokines
- blocking of TNF-α production in alveolar macrophages
- DC Maturation
- Th1 Response
- Th1, 17 Response
- Pro inflammatory cytokines Secretion
- T cell costimulation
- TNF-α and IL-6 Induction (TLR2, 4)
- Protection against aerosolized Mtb (TLR4, 9)
- Th1 Response enhancement
- IFN-γ+ CD4+ T-cells induction (TLR3, 4, 9)
- Macrophage and DC Activation
- Proinflammatory cytokine induction including IL-12

TLR9 & 8

- Unmethylated CpG
- Small Oligonucleotides
- GLA
- CAF09
- MPL/TDM
- CpG

Myobacterium tuberculosis

Internal ligands: Acylated LM, HSP 60,65, 50S ribosomal protein, Rv-0652, Chaperonin 60, E5531, Phosphatidylinositol mannoside, HBHA, Rv-0652, RpfB, Tri-acylated lipoproteins, 38-kD Ag, CpG, CAF09, MPL/TDM, CpG, Unmethylated CpG, Small Oligonucleotides.

25

activated B cells, TNF: Tumor necrosis factor, IL: Interleukin. Fonte:(FARIDGOHAR; NIKOUEINEJAD, 2017).

As lipoproteínas bacterianas são uma família de componentes da parede celular proinflamatórios encontrados nas bactérias Gram positivas e Gram negativas. A atividade estimuladora de lipoproteínas bacterianas reside em sua porção amino terminal acilada. Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4) é um lipopeptídeo tri-palmitoilado sintético que imita o amino terminal acilado de lipoproteínas bacterianas. Pam3CSK4 é um potente ativador do fator de transcrição (*factor nuclear kappa B*) NF-κB (ALIPRANTIS, 1999). O reconhecimento de Pam3CSK4 é mediado por TLR2 que coopera com TLR1 através do seu domínio citoplasmático para induzir a cascata de sinalização que leva à ativação de NF-κB (OZINSKY et al., 2000).

Quanto ao receptor TLR4, sua participação no reconhecimento do *Mtb* em murinos permanece contraditória (KLEINNIJENHUIS et al., 2011). O TLR4 é ativado pela proteína de choque térmico 60/65 (BULUT et al., 2005), proteína esta que é segregada por uma variedade de espécies de micobactérias. Estudos com células CHO (*Chinese hamster ovary*) transfectadas com TLR4 e macrófagos murinos mostrou a importância de TLR4 no reconhecimento de *Mtb* (MEANS et al., 1999) (MEANS et al., 2001). Estudos com murinos *in vivo* sobre o papel de TLR4 no reconhecimento de *Mtb* apontaram resultados conflitantes, mesmo quando a mesma estirpe de camundongo foi utilizada. Reiling e colaboradores (2002), mostraram que os camundongos deficientes de TLR4, em contraste com os deficientes de TLR2, apresentavam susceptibilidade semelhante à infecção por *Mtb* em comparação com os animais do tipo selvagem (REILING et al., 2002). Em contraste, no mesmo ano, Abel e colaboradores relataram maior crescimento micobacteriano nos pulmões, baço e fígado e uma menor sobrevivência após a infecção em comparação com animais do tipo selvagem (ABEL et al., 2002). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar a fonte dessas discrepâncias e o papel de TLR4 na infecção por *Mtb*.

TLR4 reconhece predominantemente lipopolissacarídeos - LPS (POLTORAK, 1998). Esse reconhecimento envolve a ligação de LPS com proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP) e posteriormente com CD14 que se associa fisicamente a um complexo que inclui TLR4 e MD (*Myeloid differentiation protein*)

2 (SHIMAZU et al., 1999). A formação do complexo de receptor LPS centrado em TLR4 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias através da via MyD88. A sinalização de LPS também envolve uma cascata independente de MyD88, que medeia a expressão de genes induzíveis pelo IFN (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Entre todos os receptores da família TLR, TLR9 é aquele com a distribuição tecidual mais restrita. Nos seres humanos, sua expressão constitutiva é confinada às células B e células dendríticas plasmacitóides. Já na ativação celular, TLR9 também pode ser encontrado em monócitos, neutrófilos e células T CD4⁺ (EHRlich et al., 2017; HOLTICK; SCHEULEN; BERGWELT-BAILDON, 2011; VOLLMER; KRIEG, 2009), sendo também detectado em células T reguladoras secretoras de IL10 induzidas na presença de 1- α -25-dihidroxitamina D3 (URRY et al., 2009).

CpG ODNs são oligonucleotídeos sintéticos que contêm dinucleotídeos CpG não metilados em sequências particulares (motivos CpG) (KRIEG et al., 1995). Esses motivos CpG estão presentes numa frequência 20 vezes maior em DNA bacteriano em comparação com o DNA de mamíferos. Os ODNs de CpG são reconhecidos pelo receptor TLR9 que conduz a fortes efeitos imunoestimulatórios (BAUER et al., 2001).

O reconhecimento de CpG DNA micobacteriano é realizado por TLR9 (HEMMI et al, 2000), que atua na regulação da função de neutrófilos *in vitro* (MORTAZ et al., 2010) (MORTAZ et al., 2015) e na cooperação com TLR2 para modular a resposta em células dendríticas e macrófagos, induzindo a produção de IL12 (BAFICA et al, 2005; POMPEI et al, 2007). A ausência de TLR9 em animais *knockout* para este receptor, faz com que estes animais sucumbam rapidamente à infecção, quando em contato com altas doses de *Mtb* (BAFICA et al, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que a liberação de IL12 induzida por *Mtb* em células dendríticas era dependente de TLR9 (BAFICA et al., 2005; POMPEI et al., 2007).

Já a cloroquina, um antagonista de TLR9, é uma base fraca que pode dividir vesículas ácidas tais como endossomas e lisossomas, resultando em inibição da acidificação endossomal e da atividade enzimática lisossômica. Como o pH

ácido dos endossomas é um pré-requisito para a ativação do TLR endossomal (que é o caso de TLR9), a cloroquina pode servir como antagonista para TLRs endossômicos. A cloroquina e a sua análoga quinacrina, são também conhecidas como agentes terapêuticos para doenças autoimunes tais como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, cuja atividade terapêutica se dá pela supressão da atividade de TLR9 (MACFARLANE; MANZEL, 1998; MARSHAK-ROTHSTEIN, 2006; RUTZ et al., 2004).

Outros aspectos importantes que influenciam no resultado da resposta imune contra o *Mtb* são a cinética e a quantidade de citocinas liberadas a nível do pulmão infectado e no linfonodo pulmonar drenante, capazes de gerar um gradiente de citocinas e uma combinação única de fatores solúveis dentro de cada local (ETNA et al., 2014a). A função do IFN- γ em resposta a agentes patogênicos tem sido amplamente estudada e é crítica na regulação das respostas das células T na doença micobacteriana (COOPER et al., 2002). IFN- γ é produzido por células T ativadas, células assassinas naturais (*natural killer cells* – NK) e macrófagos, e é essencial para a ativação de fagócitos e apresentação de antígenos, promoção da proliferação celular, adesão celular e apoptose (HUAMAN; DEEPE, JR.; FICHTENBAUM, 2016; ZUÑIGA et al., 2012). Nos macrófagos, o IFN- γ induz a explosão respiratória contribuindo para a produção de RNI e ROI (*reactive nitrogen intermediates* – RNI e *reactive oxygen intermediates* – ROI) (COOPER et al., 2002). A produção de grandes quantidades de ROIs e NO (óxido nítrico) por células imunes inatas é considerado um dos efeitos mais importantes do IFN- γ (ZUÑIGA et al., 2012).

Em modelos de infecção pelo *Mtb* em camundongos, o NO é essencial para a morte de *Mtb* por meio da atividade de fagócitos mononucleares. Em camundongos deficientes do gene da NO sintase 2 (iNOS -/-), a infecção com *Mtb* tem uma rápida progressão e uma maior taxa de mortalidade (COOPER et al., 2000; MACMICKING et al., 1997). Os defeitos marcantes na via de sinalização de IFN- γ , observados em camundongos deficientes em IFN- γ , provocam uma elevação na susceptibilidade às infecções micobacterianas. Esses camundongos também falham em desenvolver granulomas após a infecção pelo *Mtb*, via aerossol, com comprometimento significativo da ativação de macrófagos (COOPER et al., 1993).

No tecido pulmonar, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1, IL6 e IL18) e anti-inflamatórias (IL10) são produzidas rapidamente, em níveis elevados e mantidos por macrófagos infectados com *Mtb*, enquanto DCs produzem níveis baixos ou indetectáveis dessas citocinas (ETNA et al., 2014a). *Mtb* estimula DC a expressar um nível inicialmente baixo de IL12 e IFN- β , que posteriormente se torna robusto quando DCs maduras atingem os linfonodos em resposta a quimiocinas linfóides (GIACOMINI et al., 2001; LANDE et al., 2003; SLIGHT; KHADER, 2013). A produção dessas duas citocinas associadas a polarização Th1 é estritamente dependente do funcionamento do sistema ESX-1 (*ESAT-6 Secretion System-1*) (ETNA et al., 2014a). No entanto, na ausência da produção de IL12, outros membros da família IL12, em particular a IL23, podem criar um ambiente Th1-distorcido (COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011; COOPER; SOLACHE; KHADER, 2007; KHADER et al., 2005). Por exemplo, a liberação de IL23 por DCs desafiadas com SO2, cepa protótipo da primeira vacina de *Mtb* atenuado vivo, recentemente inserida em ensaios clínicos, compensa a falta de produção de IL12 na promoção de uma expansão Th1 (ETNA et al., 2014b). No entanto, IL23 é uma citocina que atua principalmente em conjunto com outras citocinas, notadamente IL6, IL1 β , TGF- β e TNF- α , em nódulos linfáticos para promoverem a diferenciação de células Th17, ou no tecido pulmonar infectado, para recuperar uma resposta Th17 de memória (ETNA et al., 2014a).

As células Th17 produzem IL17A (ou simplesmente IL17) (HARRINGTON et al., 2005; PARK et al., 2005), IL17F (LANGRISH et al., 2005), IL21 (KORN et al., 2007) e IL22 (LIANG et al., 2006). O receptor de IL17 (IL17RA) é expresso de forma ubíqua em diferentes órgãos, como pulmão, fígado e baço, e células DCs, macrófagos, linfócitos, células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos (YAO et al., 1995)(LIN et al., 2009). As respostas induzidas por IL17 incluem a expressão de genes pró-inflamatórios, como por exemplo, G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Fator*), quimiocinas CXC, IL6, IL8, e proteínas antimicrobianas tais como defensinas e proteínas S100, granulopoiese, recrutamento de neutrófilos e inflamação (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008).

Na TB, após a exposição ao *Mtb* e de sua chegada aos pulmões, DCs migram para os linfonodos de drenagem, onde as células T são ativadas (COOPER,

2009). Nesses linfonodos, ocorre a indução de células T que produzem IFN- γ e IL17 e estas células migram para o pulmão onde exercem a função efetora. O desenvolvimento de células Th17 é iniciado por IL6 ou IL21 na presença de baixas quantidades de TGF- β (BETTELLI et al., 2006; KORN et al., 2007; MANGAN et al., 2006; TORRADO; COOPER, 2010; VELDHOFEN et al., 2006). IL1 β e TNF também podem atuar como cofatores para a diferenciação Th17 (GEROSA et al., 2008; VAN BEELEN et al., 2007). O sinal combinatório dessas citocinas em células T recém-estimuladas induz a expressão do receptor nuclear órfão ROR γ t via *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT-3). STAT-3 e ROR γ t induzem a expressão do receptor para IL23, resultando na subsequente sinalização dessa citocina, que então estabiliza o fenótipo Th17 (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

A expressão precoce de IL17 desempenha um papel essencial como mediador do recrutamento celular, principalmente de neutrófilos via CXCL8 (MCALEER; KOLLS, 2014) e células T CXCR5+ via CXCL-13 (GOPAL et al., 2014), para compor os folículos linfóides pulmonares, visando uma ótima ativação de macrófagos e controle de *Mtb* em infecção primária. A expansão das células T $\gamma\delta$ produtoras de IL17 nos estágios iniciais da infecção por *Mtb* também ocorre via IL23 (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011). As células T de memória produtoras de IL17, então, atuam como uma população de vigilância, induzindo quimiocinas CXCL capazes de recrutar células T de memória produtoras de IFN- γ que expressam CXCR3, as quais ativam os fagócitos infectados e medeiam o cessar do crescimento bacteriano (ETNA et al., 2014a). Se a liberação antecipada de IL17 contribui para a defesa do hospedeiro contra o *Mtb* através da formação de granulomas maduros (GOPAL et al., 2014; KHADER et al., 2007), durante a infecção crônica e latente, a hiperatividade das células Th17 pode ser prejudicial, levando ao aumento da imunopatologia via IL17-CXCL2 dependente do influxo de neutrófilos e destruição tecidual, em vez da contenção da infecção no pulmão (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011).

Como mencionado anteriormente, IL10 é uma importante citocina anti-inflamatória que controla a resposta imune inata e adaptativa excessiva contra o *Mtb*. Na ausência de IL10, DCs murinas infectadas com *Mtb* migram mais rápido

do pulmão para o linfonodo drenante e produzem uma maior quantidade de IL12 (DEMANGEL; BERTOLINO; BRITTON, 2002). IL10 é produzida por fagócitos nas lesões pulmonares e reduz diretamente a expressão de TNF- α e IL12p40 (BEAMER et al., 2008; TURNER et al., 2002). Em humanos, uma produção elevada de IL10 em macrófagos em resposta a estimulação de TLR *in vitro* foi associada à tendência de desenvolver TB progressiva primária (AWOMOYI et al., 2002). De fato, uma redução mediada por IL10 das respostas de células T pode afetar a integridade do granuloma e predispor à cavitação pulmonar, o que promove a transmissão das bactérias para novos hospedeiros. Além disso, IL10 bloqueia a maturação de fagossomas, permitindo a persistência de patógenos em macrófagos alveolares humanos (O'LEARY; O'SULLIVAN; KEANE, 2011). A produção local de IL10 também prejudica a diferenciação de DCs induzindo um efeito espectador nos monócitos não infectados circulantes. Realmente, os monócitos condicionados a IL10 sofrem uma diferenciação parcial levando ao desenvolvimento de uma população heterogênea de células que expressam CD14 e níveis variáveis de CD1a (ETNA et al., 2014a).

Esses resultados indicam que o *Mtb* pode desarmar DCs por inibir sua diferenciação e, por sua vez, subverter uma vigilância imune protetora (REMOLI et al., 2011). Assim, no contexto da infecção por *Mtb*, a importância da IL10 pode ter dois lados, uma vez que exerce efeitos protetores e prejudiciais, quer atenuando a resposta inflamatória do hospedeiro ou limitando a expressão da resposta adquirida que pode permitir que a doença latente reative e progrida a TB ativa e cavitária (ETNA et al., 2014a).

Como IL10, TGF- β também é uma citocina anti-inflamatória contrária a imunidade protetora contra a TB. Após estimulação com ligantes de *Mtb*, monócitos humanos e DCs produzem TGF- β que é encontrado nas lesões granulomatosas de pacientes com TB (DAHL et al., 1996) (TOOSSI et al., 1995 apud HOSSAIN; NORAZMI, 2013). TGF- β exerce vários efeitos anti-inflamatórios que incluem a inibição da produção de ROI e RNI mediada por macrófagos (DING et al., 1990 apud HOSSAIN; NORAZMI, 2013), supressão da proliferação de células T (ROJAS et al., 1999), interferência na função de células NK e linfócitos T citotóxicos, e a subregulação da liberação de citocinas

proinflamatórias (RUSCETTI et al., 1993). A adição de TGF- β em cocultura de fagócitos mononucleares e *Mtb*, causa inibição da fagocitose e facilita o crescimento do bacilo de maneira dose-dependente (TOOSSI et al., 1995 apud HOSSAIN; NORAZMI, 2013). A presença de inibidores de TGF- β elimina os efeitos anti-inflamatórios da citocina, e assim, protegem o hospedeiro da infecção pelo *Mtb* (HIRSCH et al., 1997).

Por outro lado, essa citocina tem papel importante para células T reguladoras, cujo desenvolvimento depende de TGF- β e da expressão do fator de transcrição FoxP3, cujas células contribuem para a imunidade da TB e controle de inflamação excessiva (ETNA et al., 2014a). Importante mencionar que durante a infecção por *Mtb*, a expansão das células Th17 e Treg, bem como a conversão de Treg em produtoras de IL17, dependem da expressão de ROR γ τ (*RAR-related orphan receptor gamma*) e FoxP3, cujos níveis relativos são controlados por TGF- β , IL23 e IL6 (AFZALI et al., 2010). Estas Tregs têm múltiplos efeitos inibitórios: a) supressão direta da atividade das células T CD4⁺ através da secreção de IL10 ou expressão de TGF- β ligado à membrana; b) desativação de células apresentadoras de antígenos e, por sua vez, c) inibição da iniciação e redução do influxo de células T CD4⁺ nos gânglios linfáticos drenantes (SHAFIANI et al., 2010). Assim, sua presença nos órgãos infectados é importante para equilibrar as respostas imunes protetoras e nocivas, limitando a intensidade da resposta das células T às bactérias. No entanto, a ativação excessiva de Tregs pode exercer um papel negativo, uma vez que essas medeiam o estabelecimento da infecção persistente e a reativação da TB latente (KAUFMANN, 2013).

Diante disso, a detecção das células T reguladoras por um dos fenótipos já estabelecidos na TB (LIU et al., 2006; NAFADY-HEGO et al., 2016; SEDDIKI et al., 2006), a identificação e compreensão do seu possível papel na manutenção do balanço homeostático e no rompimento do mesmo, nos auxiliaria na busca por soluções para eliminar a infecção ou evitar o seu desenvolvimento a partir da forma latente. Desta forma, a identificação de células T reguladoras pelo fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ no sangue periférico de indivíduos TST positivos e TST negativos, bem como no desafio *in vitro* com *Mtb* em cultura de

sangue total, mediante modulação com agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9, e antagonista de TLR9 pode ser um dos caminhos para essa elucidação. Ao mesmo tempo, pretendemos entender como a modulação desses TLRs pode contribuir para a resposta ao *Mtb*, através das análises da atividade microbicida e da produção de citocinas. Dessa forma, os resultados que iremos obter oferecerá mais informações sobre a LTBI, e com isso, uma melhora na compreensão acerca dessa condição, seja em relação a indivíduos controles negativos ou pacientes com TB. Esse entendimento das modificações nas respostas imunes inata e adaptativa, como por exemplo, as alterações fenotípicas em relação à TB, podem servir como um biomarcador da reativação.

2 HIPÓTESE

Possíveis diferenças imunológicas associadas com o não desenvolvimento da TB, por indivíduos LTBI (TST positivo $\geq 15\text{mm}$), seja em relação as frequências de Tregs e monócitos e/ou modulação por TLRs, que possam sugerir ou auxiliar na identificação dos casos de LTBI e/ou na prevenção da reativação da TB.

3 OBJETIVOS

- 3.1. Averiguar a frequência de monócitos/macrófagos (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺ e CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺), no sangue periférico de indivíduos TST-, TST+ e TB;
- 3.2. Correlacionar a frequência de monócitos/macrófagos (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺ e CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺) no sangue periférico e a enduração do teste tuberculínico em indivíduos TST- e TST+;
- 3.3. Identificar os indivíduos LTBI com base na frequência de monócitos/macrófagos (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺ e CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺) e na correlação dessas frequências com a enduração do teste tuberculínico em indivíduos TST+;
- 3.4. Investigar a ação de agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9, e antagonista de TLR9 em células Tregs de culturas de sangue total desafiadas com *Mtb* de indivíduos TST- e TST+;
- 3.5. Verificar a frequência de monócitos/macrófagos (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺ e CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺), em cultura de sangue total desafiada com *Mtb* e modulada com agonistas de TLRs (2, 4 e 9) e antagonista de TLR9, em indivíduos TST- e TST+;
- 3.6. Dosar as citocinas IL10, IL17, IFN- γ e TGF- β nos sobrenadantes das culturas de sangue total infectadas com *Mtb* e moduladas com agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9 e antagonista de TLR9, em indivíduos TST- e TST+;
- 3.7. Examinar a atividade microbicida em culturas de sangue total desafiadas com *Mtb* e modulada com agonistas e antagonista de TLRs (2, 4 e 9), em indivíduos TST- e TST+.

4 MÉTODOS

4.1 Modelo do estudo

O presente estudo caracteriza-se por ser descritivo transversal, a fim de avaliar o papel *in vitro* de moduladores dos receptores tipo *Toll* (TLR2, TLR4 e TLR9) na imunofenotipagem, dosagem de citocinas e atividade microbicida de indivíduos saudáveis reativos ou não ao teste tuberculínico frente a infecção pelo *Mtb* em culturas de sangue total. Esse estudo foi conduzido nos laboratórios de Micobacteriologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.2 Considerações éticas

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. A aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde foi obtida em 30 de agosto de 2012, CAAE n 04342812.0.0000.5060, número do parecer 85575 (Anexo 1).

4.3 Pacientes e indivíduos controles

Os participantes que foram incluídos neste estudo estavam na faixa etária de 18 a 65 anos, o qual possuía como critério de exclusão: apresentar infecção pelo HIV, ser gestante, fazer uso de drogas imunossupressoras e possuir doença debilitante concomitante. Foi realizado o teste rápido para HIV em todos os participantes do estudo. Além de aceitar as condições presentes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo CEP-ES, os participantes deveriam se enquadrar em qualquer um dos grupos descritos abaixo.

Os indivíduos saudáveis (sem TB), foram identificados pelo resultado do teste tuberculínico (método Mantoux), o qual foi realizado aplicando-se 1 UI (0,02mcg) da tuberculina RT-23 por via intradérmica no terço médio da face anterior do braço dos participantes e após 72 horas, o resultado do teste foi interpretado, de

acordo com a *American Thoracic Society* e com as diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). A aplicação e interpretação do teste foi realizada no ambulatório do Núcleo de Doenças Infecciosas por profissionais de saúde devidamente treinados.

Num primeiro momento (1ª coleta) arrolamos participantes com e sem TB (Fig3). Os grupos estudados foram: indivíduos que respondem ao PPD (*Purified protein derivative*) com teste tuberculínico maior que 10 mm, **grupo TST positivo**; os indivíduos com a doença ativa, **grupo TB**; e pessoas não infectadas com a bactéria, não respondendo ao PPD, ou ainda, que respondem muito pouco ao PPD, formaram o **grupo TST negativo** (TST < 10 mm). Participaram dessa etapa 44 indivíduos, dos quais 24 participantes (17 homens e 7 mulheres, com idade entre 18-56 anos) apresentavam diagnóstico recente de TB, sendo os demais 20 indivíduos, clinicamente saudáveis (9 homens e 11 mulheres, com idade entre 14-60 anos). Destes, 5 eram TST negativo e 15 TST positivo. A mediana da idade dos indivíduos arrolados foi de 32 anos, com intervalo interquartil de 11.

Os pacientes foram atendidos no ambulatório de Tuberculose do HUCAM da Universidade Federal do Espírito Santo, ou encaminhados pelas Unidades de Saúde da Grande Vitória (Cariacica, Serra, Vitória e Viana), sendo arrolados antes de iniciar a terapia para TB. Todos os pacientes tiveram amostras de escarro coletadas para uso na baciloscopia e cultura, visando a pesquisa do *Mtb*. Pacientes com TB receberam tratamento padrão para a doença de acordo com o Consenso Brasileiro para tratamento da TB.

Num segundo momento (2ª coleta – nova coleta/arrolamento) realizamos nosso estudo apenas com indivíduos que respondiam ou não ao teste tuberculínico. Os participantes positivos para TST/PPD foram aqueles que apresentavam endurecimento acima de 15 mm, nessa etapa. O outro grupo foi formado por voluntários que apresentavam TST negativo (TST < 10mm) – grupo controle (Fig3). Os participantes foram atendidos no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo. Participaram da segunda etapa, 22 indivíduos, dos quais 10 eram homens e 12 mulheres, com idade entre 20-65

anos. Desse total de indivíduos, 9 compunham o grupo TST negativo e 13 o grupo TST positivo.

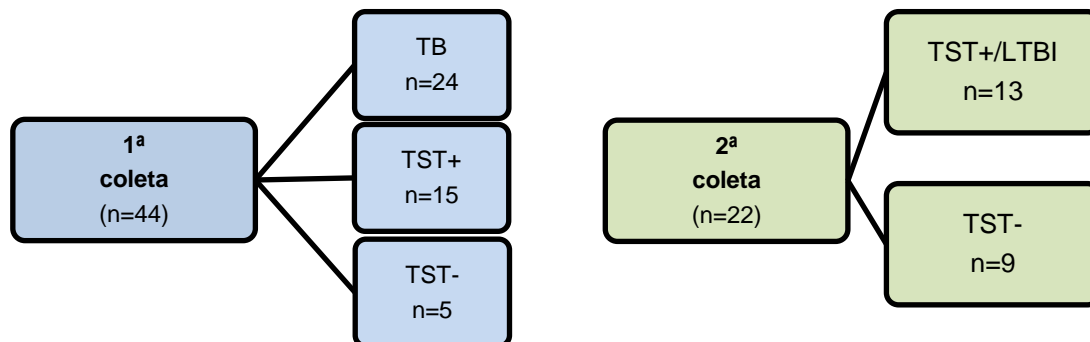


Figura 3: Esquema representativo das coletas e grupos formados em cada etapa da pesquisa. Em cada etapa foram realizados novos arrolamentos e coletas.

4.4 Baciloscopia e cultura

As amostras de escarro dos pacientes TB foram obtidas antes do tratamento anti-TB (2 amostras consecutivas). Estas amostras foram processadas no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas, da Universidade Federal do Espírito Santo. As amostras de escarros eram utilizadas no esfregaço e na inoculação em meio Ogawa (LJ – *Löwenstein-Jensen*), para obtenção a obtenção dos resultados de baciloscopia e culturas, respectivamente. Com base nesses resultados, quando positivos, os indivíduos eram incluídos no estudo no grupo TB.

4.5 Coleta de sangue periférico

Amostras de sangue periférico (10 ml de sangue) foram coletadas, por punção venosa, de todos os participantes do estudo. A coleta de sangue foi realizada logo após o consentimento por escrito. As amostras de sangue foram utilizadas para avaliação quantitativa e fenotípica das populações celulares e cultura.

Esquema resumindo as coletas e técnicas empregadas durante este estudo está representado na figura abaixo.

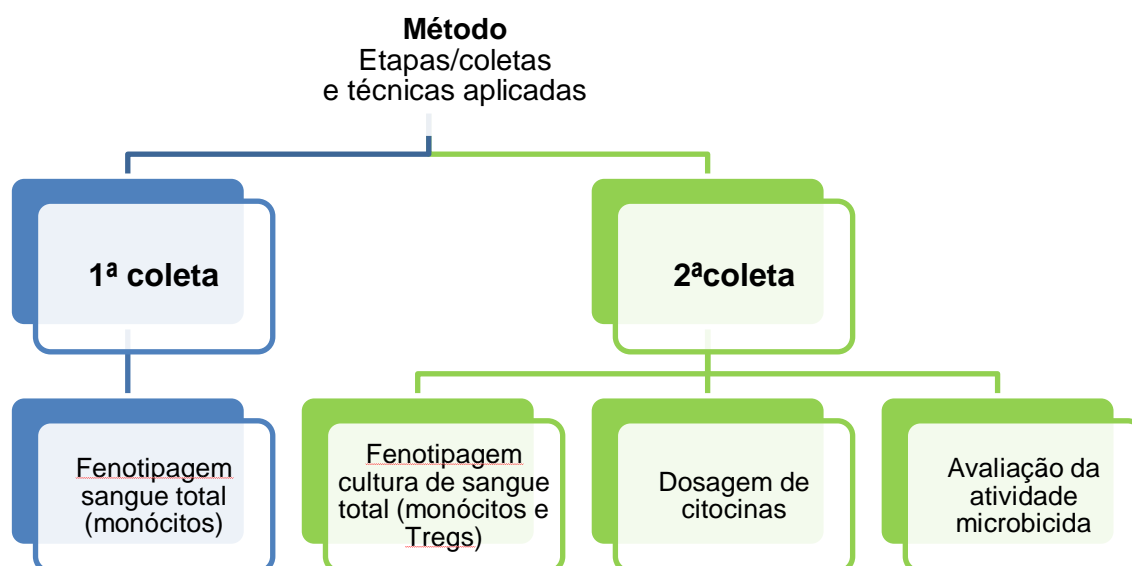


Figura 4: Esquema representativo das coletas e técnicas em cada etapa da pesquisa. Este esquema resume os métodos empregados para a obtenção dos resultados.

4.5.1 Quantificação e fenotipagem de monócitos/macrófagos e células T reguladoras

Para a realização deste procedimento, utilizou-se sangue periférico coletado em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*) e em tubo com heparina para as culturas. Com o objetivo de avaliar o fenótipo de monócitos e linfócitos T reguladores, utilizamos 100 µl desse sangue a cada tubo de citometria, ou 200 µl da cultura. Os procedimentos de marcação foram realizados de acordo com as instruções do fabricante dos anticorpos. Acrescentou-se por tubo, ainda, 50 µl de PBS (*phosphate-buffered saline* – Invitrogen - Waltham, MA, USA) 10% FCS (*fetal calf serum* – Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA). PBS com FCS e o sangue foram incubados por vinte minutos, à 4 °C, com o intuito de diminuir as ligações inespecíficas. Decorrido este tempo, cada tubo recebeu seu conjunto de anticorpos monoclonais conjugados, 2 µl de cada anticorpo (conforme quadro 2).

Para a identificação de monócitos/macrófagos, usamos anticorpos monoclonais para: CD14 FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), CD16, TLR2, TLR4 e TLR9 marcados com PE (*Phycoerythrin*), separadamente, e HLA-DR PECy5 (antigo *Cy-Chrome*). Para a marcação de células T reguladoras, os anticorpos monoclonais utilizados foram: CD4 FITC, CD25 PECy7, FoxP3 PE e CD127 Alexa Fluor 647. Para verificação de ligações inespecíficas, utilizamos anticorpos murinos, específicos para imunoglobulinas de camundongo. Os controles isotípicos utilizados em todos os procedimentos foram: IgG1-FITC, IgG2a-PE, IgG2b-PECy5, IgG1 PECy7 e IgG1 Alexa Fluor 647 (Tabela 1). O controle da técnica foi realizado através das definições de compensação e otimização do aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson (BD) Biosciences - San Jose, CA, USA), a fim de retirar a interferência e sobreposição espectral dos fluorocromos utilizados.

Após adição dos anticorpos monoclonais aos seus respectivos tubos, o sangue marcado foi incubado à 4°C, por trinta minutos. Passado este tempo, foi adicionado 1ml de solução de lise (*fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution*) (BD Biosciences) em cada tubo. Após adição desta solução, o sangue marcado passou por uma incubação de quinze minutos à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, os tubos passaram por centrifugação a 300 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* ressuspendido foi acrescido 2 ml de PBS 1% BSA (Sigma- Aldrich) em cada tubo. Os tubos foram submetidos à nova centrifugação e o *pellet* foi ressuspendido em 300 µl de solução de fixação (MAC'S FACS, *fix solution*)¹ por tubo com marcação extracelular, exclusivamente.

Nos tubos que havia a necessidade de identificação de molécula intracelular (TLR9 ou FoxP3), foram adicionados 100µl de solução de fixação, que compõe o kit de fixação e permeabilização celular (eBioscience – San Diego, CA, USA). Segundo instruções do fabricante, após adição da solução de fixação, faz-se necessário a incubação de vinte minutos à temperatura ambiente.

¹MAC'S FACS *fix solution* – contém paraformaldeído, cacodilato de sódio e cloreto de sódio

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de linfócitos T reguladores, monócitos e controles isotípicos.

<i>Marca</i>	<i>Nome</i>	<i>Marcador</i>	<i>Clone</i>	<i>Isotipo</i>
BD Pharmingen™	Mouse IgG	PE-Cy™7	MOPC-21	Ms IgG1, κ
BD Pharmingen™	Mouse IgG	Alexa Fluor® 647	MOPC-21	Ms IgG ₁ , κ
BD Simultest™	IgG	PE, FITC	X39, X40	
BD Pharmingen™	CD127	Alexa Fluor® 647	HIL-7R-M21	Ms IgG1, κ
BD Pharmingen™	CD4	FITC	RPA-T4	Ms IgG1, κ
BD Pharmingen™	CD25	PE-Cy™7	M-A251	Ms IgG1, κ
BD Pharmingen™	FoxP3	PE	259D/C7	Ms IgG1
eBioscience	CD14	FITC	61D3	Ms IgG1, κ
eBioscience	CD16	PE	eBIOCB16	Ms IgG1
eBioscience	TLR2	PE	TL2.1	Ms IgG2a, κ
eBioscience	TLR4	PE	HTA125	Ms IgG2a, κ
eBioscience	TLR9	PE	eB72-1665	Ms IgG2a, κ
eBioscience	HLA-DR	PECy5	LN3	Ms IgG2b, κ

Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE). PE-Cy™5 e PE-Cy™7 são fluorocromos que combinam PE e cianina.

Decorrido esse tempo, adicionou-se 1 ml de solução de permeabilização (diluição conforme indicado no manual – 1:10), seguida de centrifugação a 300 x g por cinco minutos e posterior descarte do sobrenadante. 2 µl do anticorpo FoxP3 ou TLR9 junto com 100 µl de solução de permeabilização foram acrescentados a cada tubo, os quais passaram por um período de incubação de trinta minutos. Ao fim desse período, mais 1ml de solução de permeabilização foi colocada em cada tubo, que foi submetido a mais um processo de centrifugação de 300 x g por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em 300 µl de solução MAC'S FACS.

As amostras com marcação (extra e intracelular) foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e os dados foram obtidos através do software CellQuest (BD Biosciences) e analisados no FlowJo LLC (Ashland, Ore; versão 10.0.7). Adquiriu-se sessenta mil eventos totais por tubo, visto que as regiões (*Gates*) R1 ou R2 delimitavam as populações de monócitos e células T, respectivamente. Os monócitos foram definidos a partir do gráfico de distribuição pontual SSC (*side scatter*) versus HLA-DR⁺ (Fig5A), seguido de CD14⁺ FITC versus qualquer marcador conjugado com PE (x PE), tais como: CD16⁺, TLR2⁺, TLR4⁺ e TLR9⁺. A análise de monócitos/macrófagos feita em R1 obteve o fenótipo CD14⁺ x⁺ HLA-DR⁺(Fig 5B).

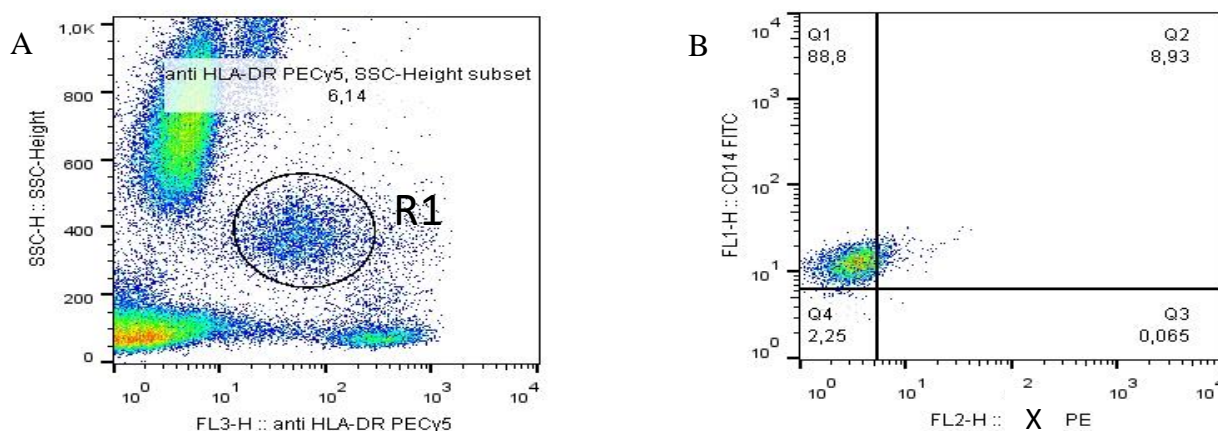


Figura 5: Gráficos de distribuição pontual exemplificando a análise de marcadores que definiram os fenótipos monócitos/macrófagos. A) Gráfico de distribuição pontual SSC (*side scatter*) versus HLA-DR PECy5 para definição das regiões de análise monócitos/macrófagos, gate R1. B) Gráfico de distribuição pontual entre os marcadores CD14 FITC e x PE, para obtenção da subpopulação CD14⁺x⁺HLA-DR⁺ (retângulo superior direito do quadrante).

(linfócitos), montamos um histograma para CD127⁻ Alexa Fluor 647 seguido do gráfico de distribuição pontual CD25⁺ PECy7 versus FoxP3⁺ PE, para definição de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻). A frequência de células T reguladoras foi utilizada para a obtenção dos dados estatísticos (Fig6).

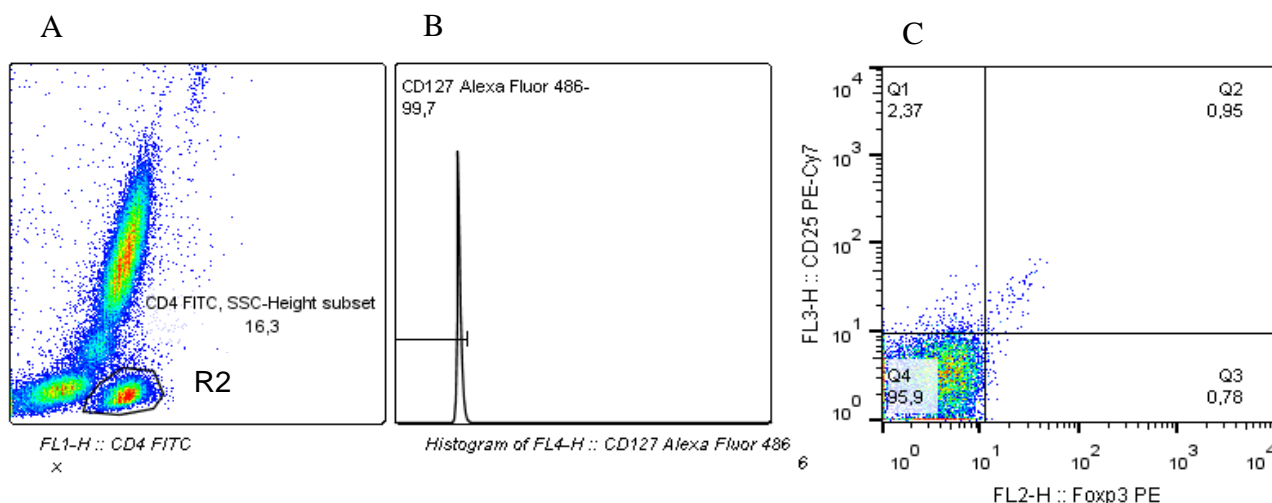


Figura 6: Gráficos de distribuição pontual exemplificando a análise de marcadores que definiram os fenótipos dos linfócitos T reguladores. A) Gráfico de distribuição pontual SSC (*side scatter*) versus CD4 FITC e seleção de linfócitos T CD4⁺, gate R2. B) A partir deste gate o histograma para células CD127 foi construído e selecionamos a população CD127⁻. Com base nela o próximo gráfico foi montado. C) Gráfico de distribuição pontual entre os marcadores CD25 PECy7 e FoxP3 PE, para obtenção da subpopulação T reguladoras; CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ (retângulo superior direito do quadrante – Q2).

4.6 Seleção, preparo e quantificação do isolado de *Mycobacterium tuberculosis*

Para a infecção micobacteriana *in vitro* nas culturas de sangue total foi utilizada a cepa ATCC 27294 (H37Rv), como referência de virulência. A cepa foi crescida em meio de cultura (Ogawa-Kudoh) a 37 °C durante 21 dias, onde as bactérias encontravam-se em fase logarítmica de crescimento. Após esse período, as colônias foram retiradas dos frascos de cultura com auxílio da alça bacteriológica e inoculadas em tubos com tampa de rosca contendo pérolas de vidro e 2 ml de PBS com 0,05% de Tween 80. Em seguida, os tubos foram agitados por 1 minuto, a fim de romper os grumos de micobactérias. Após a agitação os tubos

permaneceram em repouso por 30 minutos. O sobrenadante obtido após esse período foi retirado utilizando pipeta Pasteur e armazenado em outros tubos com tampa de rosca, sendo agitados rapidamente, sempre que utilizados, no intuito de manter a suspensão homogênea.

Em paralelo, foram separados e preparados tubos de rosca sem pérolas de vidro, contendo 5ml de PBS com 0,05% de Tween 80. A esses, foram adicionadas algumas gotas da suspensão bacteriana devidamente homogeneizada. Para verificar a concentração bacteriana obtida, a densidade óptica (DO) da suspensão foi medida em espectrofotômetro a 265 nm, sendo ajustada para o valor desejado (DO = 1). Para isso, adicionava-se PBS com 0,05% de Tween 80 ou a suspensão da bactéria para obter a DO de 1. Ao final, o volume obtido foi transferido para um tubo plástico de 50ml e centrifugado a 2000 x g sem freio, durante 30 minutos para formação do *pellet* contendo as micobactérias. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado, o *pellet* ressuspensionado em 50 ml de PBS com 0,05% de Tween 80 e novamente centrifugado a 2000 x g sem freio, durante 30 minutos (primeira lavagem). Após a segunda lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado em 1,56 ml de PBS com 80% de Glicerol e 3,44 ml de 7H9 suplementado com OADC, homogeneizado, aliquoteado no volume de 500 µl por criotubos, e armazenados a -70°C (KIM; KUBICA, 1972, 1973).

Após o congelamento das alíquotas, as suspensões micobacterianas foram descongeladas e utilizadas para padronizar a concentração estoque obtida. Para isso, antes do uso a alíquota, foi retirada do armazenamento e descongelada em estufa a 37 °C por uma hora, e em seguida, 3 ciclos de sonicação em sonicador LCX Lysor (Abbott Probe System - Des Plaines, IL, USA) por 10 segundos, com intervalos de 5 minutos entre cada ciclo, para reduzir os agregados de micobactéria (ORDWAY et al., 2014). Após a sonicação, seguiu-se a diluição seriada da suspensão em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, HEPES 1M - Gibco Invitrogen). Foi adicionado ao primeiro tubo de vidro, 100 µl de suspensão bacteriana estoque a 900 µl de meio RPMI, homogeneizado, equivalente a diluição 1:10. O processo foi repetido, transferindo 100 µl do conteúdo do tubo recém diluído para o próximo

tubo contendo 900 µl de RPMI, até a diluição 1:10⁹. Para cada diluição, 3 inóculos de 30 µl cada, foram plaqueados em placas tripartidas contendo meio *Middlebrook 7H11 (BD)*, *Middlebrook OADC Enrichment (BD)* e Glicerol (C3H5(OH)3 – Vetec/Sigma-Aldrich).

O crescimento bacteriano foi acompanhado por 21 dias em estufa a 37 °C, sendo a contagem das colônias realizada no 14º e 21º dias. O número de colônias observadas foi utilizado para determinar a concentração bacteriana armazenada. Para cada experimento de infecção esse procedimento foi repetido para manter o Controle da Concentração do Inóculo (CCI). Para infecção das culturas de sangue total, utilizou-se a diluição da bactéria para o *multiplicity of infection (MOI)* de 1:1 (uma bactéria para 1 macrófago).

4.7 Ensaios da atividade dos receptores tipo *Toll*. Preparo do sangue total - Modulação do sinal de TLR2, TLR4 e TLR9

Para avaliar o papel dos receptores tipo *Toll* (TLR2, TLR4 e TLR9) frente à infecção com *Mtb*, a atividade de cada receptor isoladamente foi obtida a partir da mistura do sangue periférico heparinizado (500 µl) a RPMI 1640 completo (500 µl), com estímulo individual de agonista de TLR2, TLR4 ou TLR9 (*Human TLR1-9 agonist kit, InvivoGen – San Diego, CA, USA*), ou antagonista de TLR9 (*Chloroquine, Imgenex- San Diego, CA, USA*). As concentrações de uso na cultura com volume final de 1 ml, de acordo com as instruções dos fabricantes, são mostradas na tabela abaixo. O agonista em RPMI 1640 completo adicionado ao sangue foi disposto em tubo 1,5 ml permanecendo em rotação contínua por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% CO₂, ao passo que o estímulo com antagonista de TLR9 seguiu uma incubação de 1 hora. Posteriormente, estas amostras seguiram para a infecção.

Tabela 2: Concentração dos agonistas e antagonista de TLR2, TLR4 e TLR9 utilizados na estimulação das culturas de sangue total.

<i>Estímulo</i>	<i>Concentração Estoque</i>	<i>Concentração de Trabalho</i>
TLR2 – Pam3CSK4	100 µg/mL	0,2 µg/mL
TLR4 – <i>E. coli</i> K12 LPS	100 µg/mL	1 µg/mL
TLR9 – ODN2006	500µM	50µM
Antagonista TLR9 - Chloroquine	100 mM	2,5 µM

4.7.1 Infecção do sangue total *in vitro* com *M. tuberculosis*

A fim de realizar as culturas de sangue total, tubos plásticos de 1,5 ml foram identificados como se segue. O tubo C, correspondia ao tubo controle, a ele, foi adicionado a mistura de sangue e RPMI completo. O tubo B representava o controle positivo, este recebia a mistura de sangue e RPMI 1640 completo e a suspensão bacteriana da cepa H37Rv, na concentração de 1:1. Nos tubos 2, 4, 9 e ant9 foram adicionados ao sangue, RPMI completo com o agonista de TLR (TLR2, TLR4, TLR9) ou o antagonista de TLR9, respectivamente, e após a incubação destes estímulos, como descrito anteriormente, realizamos a infecção com a suspensão da cepa H37Rv, na concentração de 1:1 ou seja, WBA - *whole blood bactericidal activity* (WALLIS et al., 2001). Assim, os tubos permaneciam em cultura com rotação contínua a 37 °C e 5% CO₂ por 72 horas. Após este tempo, as culturas foram utilizadas nas etapas de imunofenotipagem, dosagem de citocinas e atividade microbica.

4.7.2 Avaliação da Atividade Microbicida em cultura de sangue total

Para investigação da atividade microbicida, utilizou-se o volume final de 800 µl restante da cultura de sangue total (para todas as condições; controles e estímulos). Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10000 x g, retirava-se aproximadamente 600 µl do sobrenadante obtido e armazenava-o a -70 °C para posterior dosagem de citocinas. A adição de 900 µl de água estéril a cada tubo da cultura foi realizada para promover a lise das células sanguíneas, liberando para o meio as bactérias (WALLIS et al., 2001). Os tubos foram agitados por 30 segundos e permaneciam em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, seguidos de uma nova agitação e centrifugação a 10000 x g por 10 minutos. Posteriormente, foram removidos e descartados 800 µl do sobrenadante de cada tubo. Do volume restante foram realizadas diluições seriadas em PBS com 0,05% de Tween 80. De acordo com a concentração de infecção, realizavam-se quatro diluições da amostra, sendo plaqueadas as diluições de 10^{-2} a 10^{-4} em placas de Petri tripartidas contendo meio *Middlebrook 7H11 (BD)*, *Middlebrook OADC Enrichment (BD)* e Glicerol (Vetec). Após o plaqueamento, as placas foram mantidas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂ e acompanhadas durante 21 dias, sendo realizada a contagem das colônias no 14º e 21º dias.

4.7.3 Detecção e quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para o ensaio imunoenzimático, utilizou-se o teste Human ELISA Ready-SETGo (eBioscience, Inc. California, San Diego, USA). Desta forma, as amostras de 72 horas de cultura que foram devidamente armazenadas a -70 °C, foram utilizadas para quantificação de IL10, IL17A, IFN-γ e TGF-β. O teste baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos para cada um dos marcadores acima e foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, microplacas de 96 poços de alta afinidade (COSTAR 9018 - *Corning Life Sciences*), foram sensibilizadas utilizando-se 50 µl/poço de uma solução de anticorpos monoclonais de captura (250X), diluídos em uma solução

tamponada (*Coating Buffer* 1X) e permaneceram por um período de 12 horas (*overnight*) a 4 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com 300 µl/poço de uma solução com PBS 1X e 0,05% de Tween-20, entre cada lavagem foi respeitado o tempo de um minuto (“tempo de molho”). Terminada a lavagem, iniciou-se o bloqueio de sítios inespecíficos da placa, adicionando aos poços 200 µl de solução diluente (*Assay Diluent* 1X), com a finalidade de preencher os espaços não ocupados pelos anticorpos de captura. A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e lavada novamente, seguindo o processo descrito anteriormente. Para os testes de IL10, IL17A e IFN-γ foram adicionados 50 µl de amostra em cada poço (em duplicata), sendo que para as dosagens de IL10 e IFN-γ as amostras foram previamente diluídas 10 vezes com solução diluente (*Assay Diluent* 1X), e os valores ajustados após a dosagem utilizando-se o fator de diluição de 10X.

Para a detecção e quantificação da citocina TGF-β, 100 µl das amostras foram tratadas com 20 µl de HCl [1N] a fim de que as formas latentes desta citocina sejam ativadas em formas imunorreativas. As amostras seguiram incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida foram neutralizadas com 20 µl de NaOH [1N]. Nesta etapa também foi preparado a curva padrão a partir de diluições seriadas (1:2) da solução padrão dos testes (*Top standard solution*). A diluição para a curva padrão foi realizada respeitando a sensibilidade pré-estabelecida de cada teste, sendo de 300 pg/ml a 2 pg/ml para IL10, 500 pg/ml a 4 pg/ml para IL17, 500 pg/ml a 4 pg/ml para IFN-γ e de 8000 pg/ml a 60 pg/ml para o TGF-β. Em todas as dosagens foram utilizados poços com o branco do teste (50 µl de *Assay Diluent* 1X) e para a dosagem de TGF-β, além do branco, serão aplicados 50µl de meio de cultura (RPMI 1640 completo) previamente acidificado e neutralizado, já que o soro bovino fetal poderia conter níveis altos de TGF-β. Após a aplicação das amostras e padrões, as placas foram incubadas por 12h (*overnight*) a 4 °C, seguida de cinco lavagens com 300 µl/poço de uma solução com PBS 1X e 0,05% de Tween-20. Em seguida, adicionou-se 50 µl/poço do anticorpo de detecção (250X), diluídos em *Assay Diluent* 1X, e as placas foram novamente incubadas por 1h, seguida de novas lavagens. Após as lavagens, adicionou-se 50 µl/poço de uma solução de avidina-HRP (250X)

diluída, incubando-se por 30 minutos. As placas foram lavadas sete vezes, com tempo de molho de 1 a 2 minutos, e em seguida, foi adicionado 50 µl/poço de uma solução substrato TMB 1X (Tetrametilbenzidina). Após 15 minutos foi adicionado aos poços 25 µl da solução de parada (H₃PO₄ [1M]) e realizou-se a leitura em leitor de placa SpectraMax M3 (*Molecular Devices*) utilizando a diferença entre os comprimentos de onda de 570 nm e 450 nm. Os valores obtidos com o padrão foram utilizados para a construção da equação da reta. Os resultados das amostras submetidos a esta equação da reta resultaram nas dosagens que foram subtraídas dos valores dos controles das amostras, retirando assim qualquer interferente relacionado às citocinas basais.

4.8 Análises Estatísticas

Dados com distribuição normal e paramétricos foram avaliados através do Teste-t de *Student* (pareado na análise intragrupos e não-pareado intergrupos) para os dados de frequência de Treg e de monócitos, de atividade microbicida e de dosagem de citocinas. As correlações pelo coeficiente linear de Pearson foram utilizadas na comparação entre a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 e os resultados do teste tuberculínico. Foi utilizado o programa Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para essas análises. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Definição dos nossos casos de infecção TB Latente (LTBI)

5.1.1. Caracterização dos indivíduos do estudo

Diante da possibilidade de contato com *Mtb*, avaliamos o fenótipo e frequência de monócitos/macrófagos em sangue periférico na presença ou não de TB Latente.

5.1.2. Frequência e fenótipo de Monócitos/Macrófagos em sangue periférico na presença ou ausência de infecção pelo *Mtb*

Para a pesquisa de moléculas de ativação/estimulação em monócitos/macrófagos (CD14+HLA-DR+) utilizamos os marcadores CD16, TLR2, TLR4 e TLR9. A expressão destes marcadores foi diferente entre os grupos do estudo (Fig7). As moléculas TLR2 (Fig7A - $p=0,017$; $p<0,0001$), TLR4 (Fig7B - $p=0,02$; $p=0,0001$) e CD16 (Fig7D - $p=0,016$; $p<0,0001$), foram menos expressas no grupo TST- quando comparado aos demais grupos TST+ e TB, respectivamente. Já para TLR9 (Fig7C), observamos diferença apenas entre os grupos TST+ e TB ($p=0,002$). Na correlação entre marcadores e o resultado do teste tuberculínico, observamos a existência de correlação positiva entre TST/PPD e a expressão de todos os marcadores (TLR2, TLR4, TLR9 e CD16) nos participantes que possuíam resultados superiores a 15 mm (Fig8A-D). Resolvemos separar o grupo TST+ com base nessa correlação em dois grupos distintos, TST+ BR (baixa resposta) e TST+ AR (alta resposta) e reanalisamos expressão dos marcadores imunológicos estudados (Fig9).

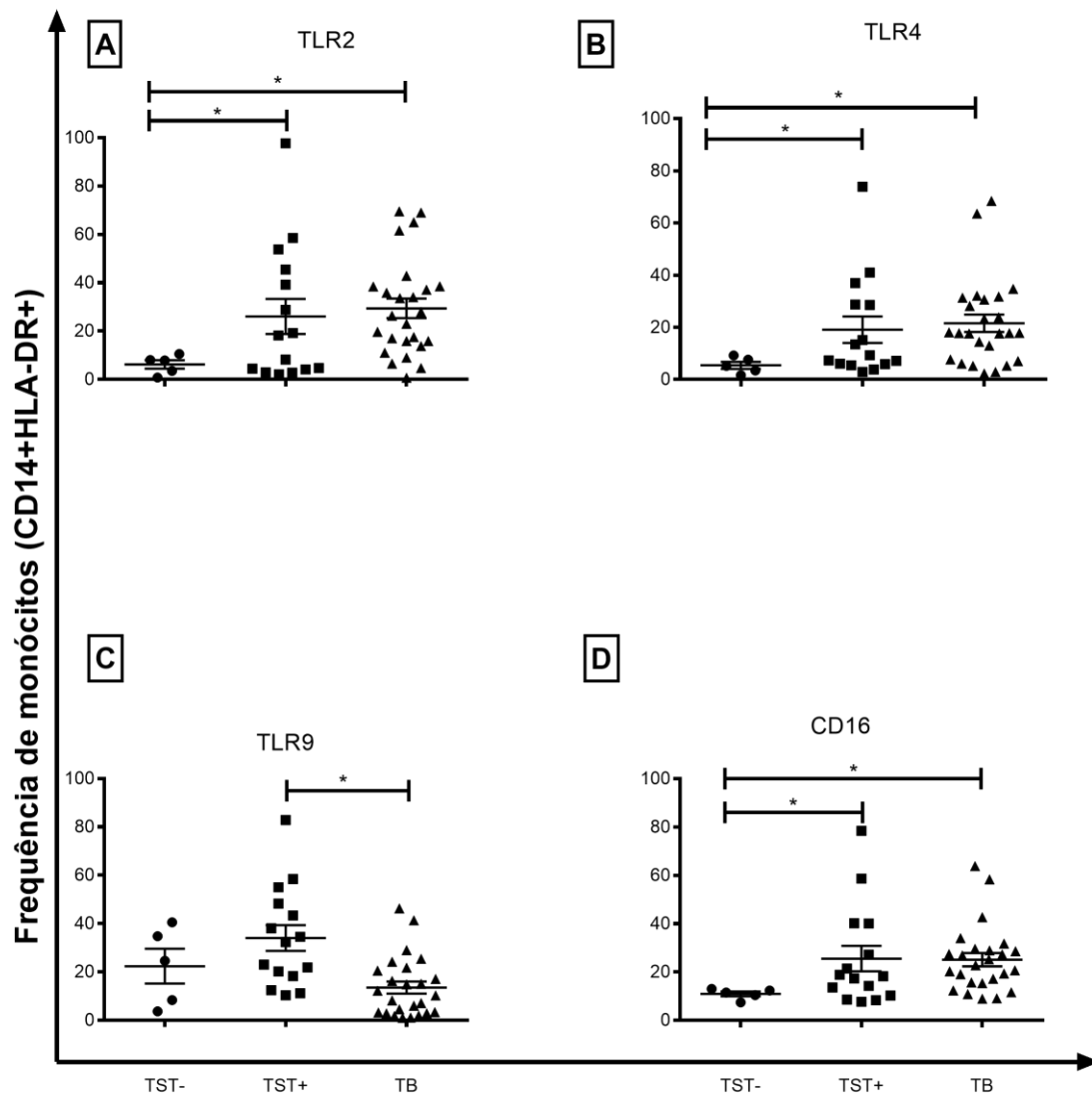


Figura 7: Análise de marcadores de ativação/coestimulação (CD16⁺, TLR2⁺, TLR4⁺ e TLR9⁺ - conjugados com PE) em Monócitos/macrófagos CD14⁺FITC HLA-DR⁺PEPCy5. Identificação em sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=24); e indivíduos sem TB (TST- e TST+): TST- (n=5) e TST+ (n=15). A) Células CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺; B) Células CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺; C) Células CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺; D) Células CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. *Os valores de $p \leq 0,05$ foram significantes.

Nessa separação observamos diferenças interessantes entre os grupos. Para TLR2, o grupo TST negativo mostrou-se diferente dos grupos TST+AR e TB, $p=0,005$ e $p<0,0001$, respectivamente. Alteração também foi observada para TST+BR em relação aos grupos TST+AR ($p=0,004$) e TB ($p<0,0001$). Situação similar foi observada para os marcadores TLR4 e CD16. Diferenças entre TST- e os grupos TST+ AR e TB (TLR4: $p=0,01$ e $p=0,0001$; CD16: $p=0,009$ e $p<0,0001$) e o grupo TST+BR em relação aos grupos TST+AR e TB (TLR4:

$p=0,01$ e $p<0,0001$; CD16: $p=0,009$ e $p=0,0001$), respectivamente. Já o marcador TLR9, constatamos diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos TST+AR e TB ($p=0,006$). Essa análise separada nos permitiu observar certa semelhança entre os grupos TST- e TST+BR e também entre os grupos TST+AR e TB. O que nos leva a supor que os indivíduos TST+AR possam ser nossos casos de LTBI. Com base nisso, passaremos a utilizar em nosso estudo apenas indivíduos TST- (< 10 mm) e TST+ (≥ 15 mm) para a investigação da LTBI.

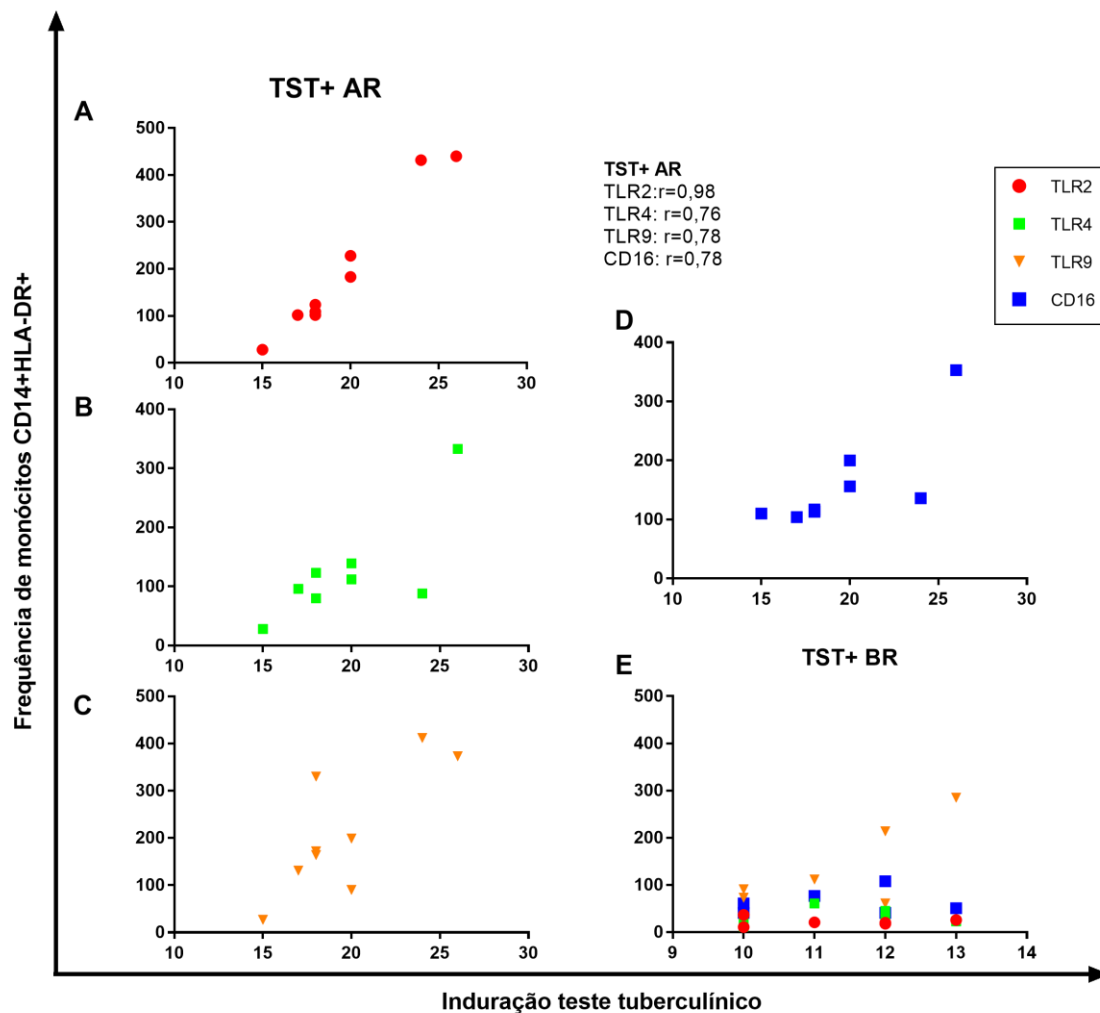


Figura 8: Correlação de Pearson (r): correlação entre células monocíticas CD14+HLA-DR+ expressando os marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 e os resultados do teste tuberculínico (induração em mm). A-D) TST+ alta resposta (AR) foram pessoas com induração igual ou superior a 15 mm. E) TST+ baixa resposta (BR) foram indivíduos com resultados de induração entre 10 e 15 mm. Os valores de r presentes no gráfico apresentam significância estatística ($p \leq 0,05$).

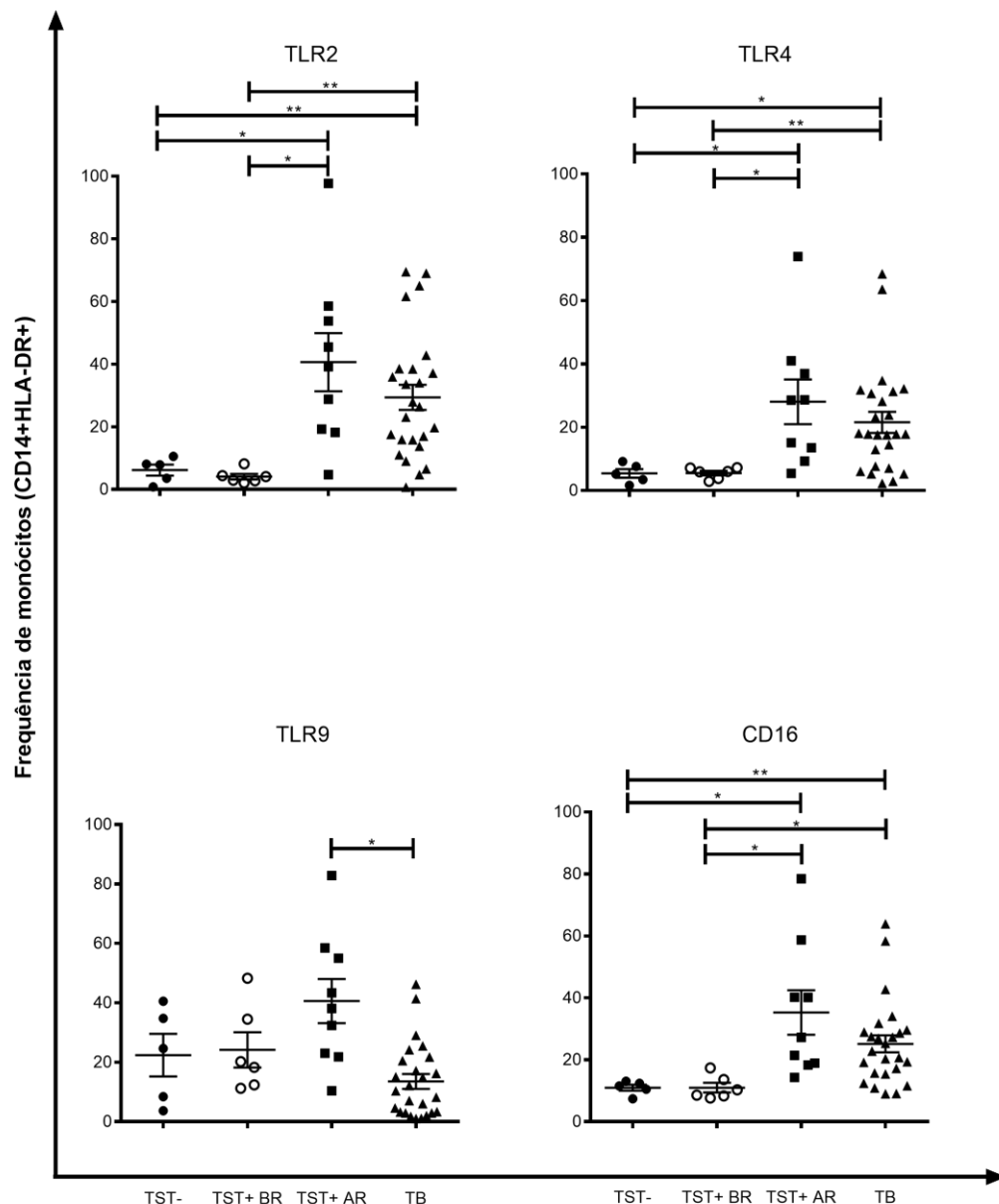


Figura 9: Análise de marcadores de ativação/coestimulação (CD16⁺, TLR2⁺, TLR4⁺ e TLR9⁺ - conjugados com PE) em Monócitos/macrófagos CD14⁺FITC HLA-DR⁺PEPCy5. Identificação em sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=24), TST- (n=5), TST+ BR (n=6) e TST+ AR (n=9). As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. Os asteriscos representam valores de p significantes (*p≤0,05 e **p<0,0001).

5.2 Análise dos casos de infecção TB Latente

5.2.1. Caracterização dos indivíduos do estudo

De acordo com os resultados do primeiro momento desse estudo, e por acreditarmos que os indivíduos TST+AR, pelo perfil apresentado, poderiam estar com LTBI, e com isso albergando o bacilo de Koch, o que contribuiria para tal

situação? Entre tantas possibilidades, neste segundo momento do estudo avaliamos o fenótipo de células T reguladoras e monócitos em cultura de sangue total, bem como a atividade microbicida e a produção de citocinas nessas culturas, em resposta a estimulação ou bloqueio de receptores *Toll* que estão mais associados com a TB (TLR2, TLR4 e TLR9). Para tanto, os indivíduos que respondem ao PPD, com TST acima de 15 mm, fazem parte do grupo TST positivo, os quais julgamos apresentar a infecção latente, e os indivíduos que não respondem, ou respondem de forma muito branda ao PPD, com valores de TST/PPD < 10 mm, formam o grupo TST negativo.

5.2.2. Atividade Microbicida dos indivíduos TST- e TST+ em culturas de Sangue Total.

Com o objetivo de avaliar a atividade microbicida nos grupos estudados, este ensaio foi conduzido em cultura de sangue total, no qual o desafio foi realizado com a cepa H37Rv de *Mtb* por um período de 72 horas. Indivíduos TST- durante a infecção *in vitro* com a cepa virulenta de *Mtb*, apresentaram maior atividade microbicida ($p=0,008$) que os participantes do grupo TST+ (Fig10).

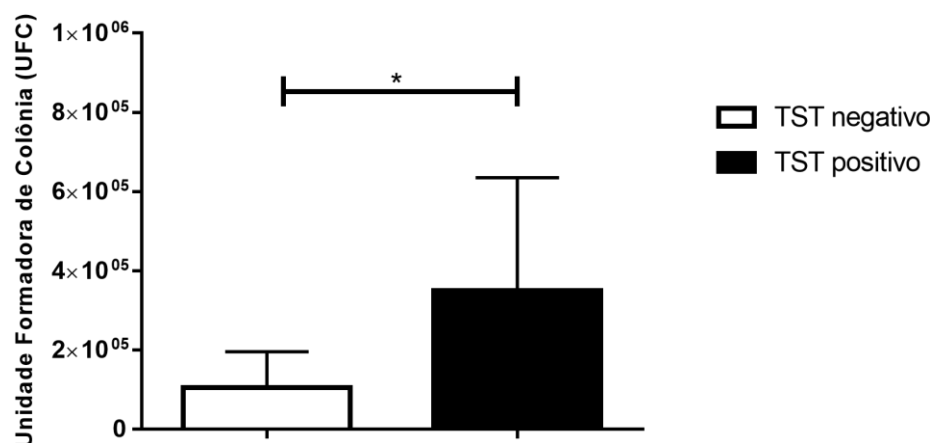


Figura 10: Atividade microbicida em indivíduos TST- e TST+. Desafio *in vitro* com a cepa de *Mtb* H37Rv por 72h de incubação. Quanto menor o quantitativo de unidades formadoras de colônias maior a atividade microbicida. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos * $P \leq 0,05$ foi considerado significante.

5.2.3 Frequência de monócitos do sangue periférico: *ex vivo* e *in vitro*

Para avaliar a frequência de monócitos/macrófagos de indivíduos que respondem ou não ao teste tuberculínico após infecção com *Mtb*, resolvemos repetir a imunofenotipagem em sangue total fresco nesses novos grupos (TST- n=3, TST+ n=3), bem como nas células provenientes da cultura infectada (Fig11).

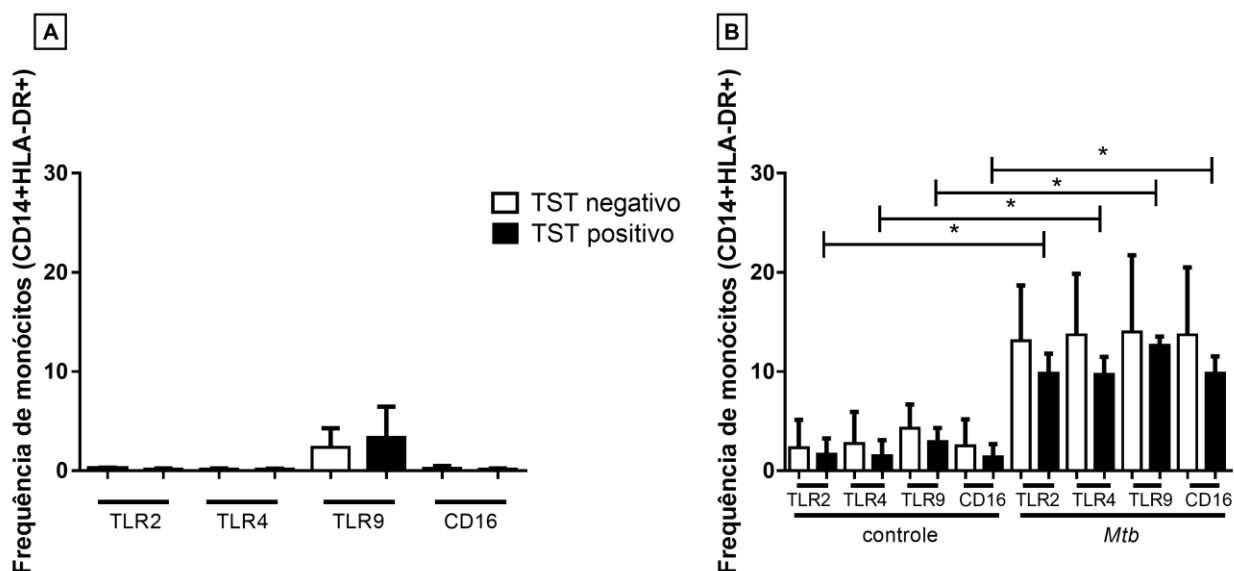


Figura 11: Análise da expressão dos marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 em monócitos/ macrófagos de indivíduos TST- e TST+. A) Fenotipagem em sangue periférico fresco; B) Fenotipagem em células da cultura de sangue total, infectada *in vitro* com a cepa de *Mtb* H37Rv. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. *Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

Não houve diferença nos resultados obtidos no procedimento em sangue fresco (Figura 11A). Nas culturas (Figura 11B), também não observamos diferença entre os grupos do estudo. Porém, no grupo TST+ houve um aumento de expressão dos marcadores durante a infecção pelo *Mtb* (TLR2: $p=0,04$; TLR4: $p=0,009$; TLR9: $p=0,004$ e CD16: $p=0,01$), enquanto que no grupo TST- nada foi constatado. Como feito para sangue fresco na primeira etapa do projeto, realizamos a análise de correlação entre os marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 e os resultados de PPD/TST só que desta vez, para as células provenientes da cultura infectada (Fig12).

Apenas a correlação entre TST e marcadores nas células infectadas no grupo TST+ (Fig 12D) foram observadas. Os marcadores TLR9 ($r=0,998$ e $p=0,03$) e CD16 ($r=0,997$ e $p=0,04$) apresentaram correlação positiva com o resultado do teste tuberculínico.

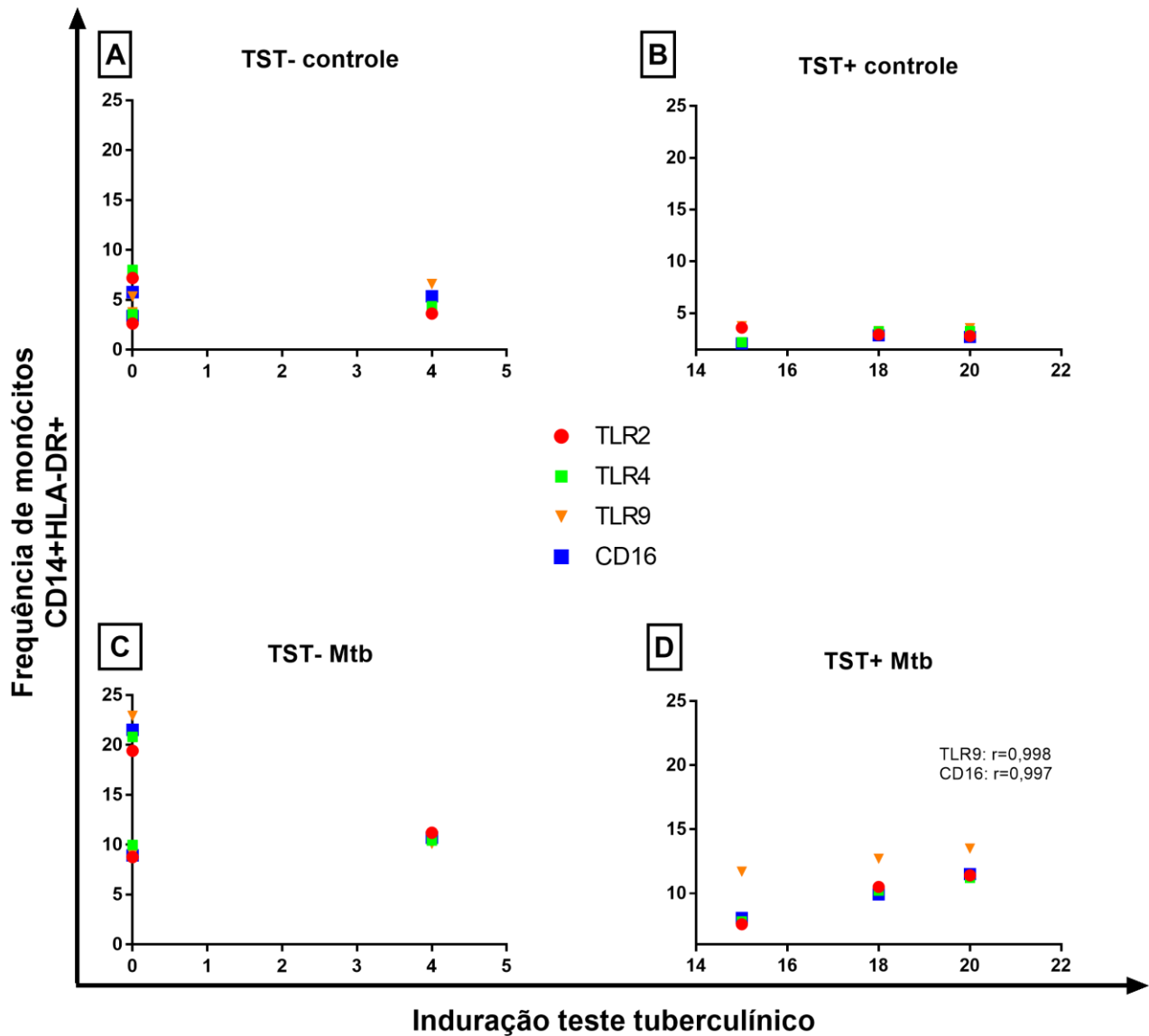


Figura 12: Correlação de Pearson (r): correlação entre células monocíticas CD14+HLA-DR+ (%) expressando os marcadores TLR2, TLR4, TLR9 e CD16 e os resultados do teste tuberculínico (induração em mm) em cultura de sangue total infectada ou não com *Mtb*. A) Cultura sangue total não infectada do grupo TST-; B) Cultura sangue total não infectada do grupo TST+; C) Cultura sangue total infectada do grupo TST-; D) Cultura sangue total infectada do grupo TST+. TST- ($n=3$) e TST+ ($n=3$). TST- (induração < 5 mm) e TST+ (induração ≥ 15 mm). Os valores de r presentes no gráfico apresentam significância estatística ($p \leq 0,05$).

5.2.3 Atividade Microbicida em culturas de Sangue Total após modulação dos TLRs.

Realizamos o ensaio de atividade microbicida no sangue total para verificar a existência de uma possível modulação por receptores TLR2, TLR4 e TLR9 no mecanismo de defesa do hospedeiro contra o *Mtb*. Para tanto, as culturas de sangue total de indivíduos TST- (n=9) e TST+ (n=10) receberam a modulação com agonistas ou antagonista de TLRs, seguida por infecção com a cepa H37Rv por 72 horas.

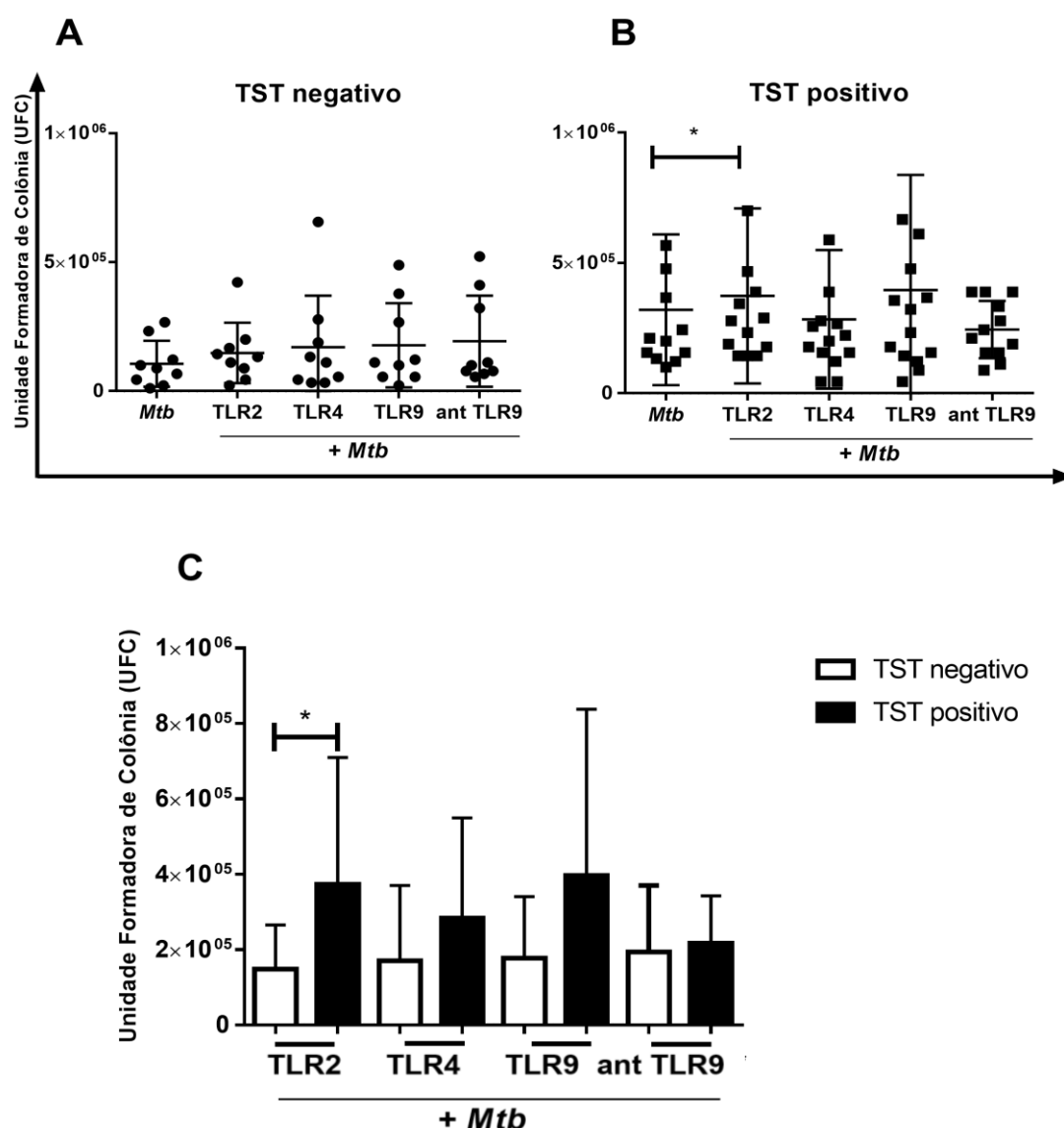


Figura 13: Análise da atividade microbicida nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb*, na presença de agonistas de TLR2, TLR4, TLR9 ou antagonista de TLR9. Análise intragrupos: A) Unidade Formadora de Colônia (UFC) da cepa *Mtb* H37Rv no grupo TST- (n=9); B) UFC da cepa H37Rv no grupo TST+ (n=10). C) Unidades Formadoras de Colônia na análise intergrupos. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. * Os valores de $p < 0,05$ foram significantes.

Indivíduos TST- durante a infecção *in vitro* com a cepa virulenta de *Mtb* não apresentaram qualquer alteração significativa frente a tais modulações (Fig13A). Já nos participantes do grupo TST+ notamos redução significativa na atividade microbida quando comparamos as condições de infecção, com e sem agonista de TLR2 ($p=0,04$; Fig13B). Ao analisarmos a atividade microbida entre os grupos estudados (Fig13C), vimos que o grupo TST+ mostra menor capacidade em conter o bacilo durante a infecção com a cepa virulenta H37Rv. Esta diferença torna-se mais evidente entre as condições de infecção com modulação por agonista de TLR2 ($p=0,04$).

5.2.4 Frequência de células T reguladoras na cultura de sangue total após modulação de TLR2, TLR4 e TLR9 e infecção com *M. tuberculosis* H37Rv

Com o intuito de avaliar a frequência de células T reguladoras *in vitro* durante infecção pelo *Mtb*, e o papel modulador dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 nessa população celular, realizamos a análise fenotípica de Treg, através da citometria de fluxo, de amostras de cultura de sangue total dos grupos TST- ($n=9$) e TST+ ($n=10$) 72 horas após exposição à cepa H37Rv.

Ao analisarmos os grupos separadamente, observamos variação na frequência de células Tregs no grupo TST+. No grupo TST- nenhuma diferença foi constatada (Figura 14A). Mesmo com poucos indivíduos fomos capazes de encontrar redução estatisticamente significativa na frequência de Tregs no grupo TST+ durante a infecção com *Mtb*, com relação a presença ou não da cloroquina (controle versus *Mtb* $p=0,04$; *Mtb* versus antTLR9 $p=0,01$), antagonista de TLR9 (figura 14B).

Quando avaliamos a frequência de Tregs entre os grupos do estudo, o grupo TST+ apresentou maior frequência dessas células na presença ou ausência de infecção pelo *Mtb*, exceto quando sobre efeito da cloroquina, cuja condição existe similaridade entre os grupos (Figura 14C). Essa maior frequência foi estatisticamente significativa entre as culturas em que havia somente bactérias ($p=0,008$), ou nas que além da suspensão bacteriana colocamos os agonistas, TLR2 ($p=0,02$), TLR4 ($p=0,03$) e TLR9 ($p=0,04$).

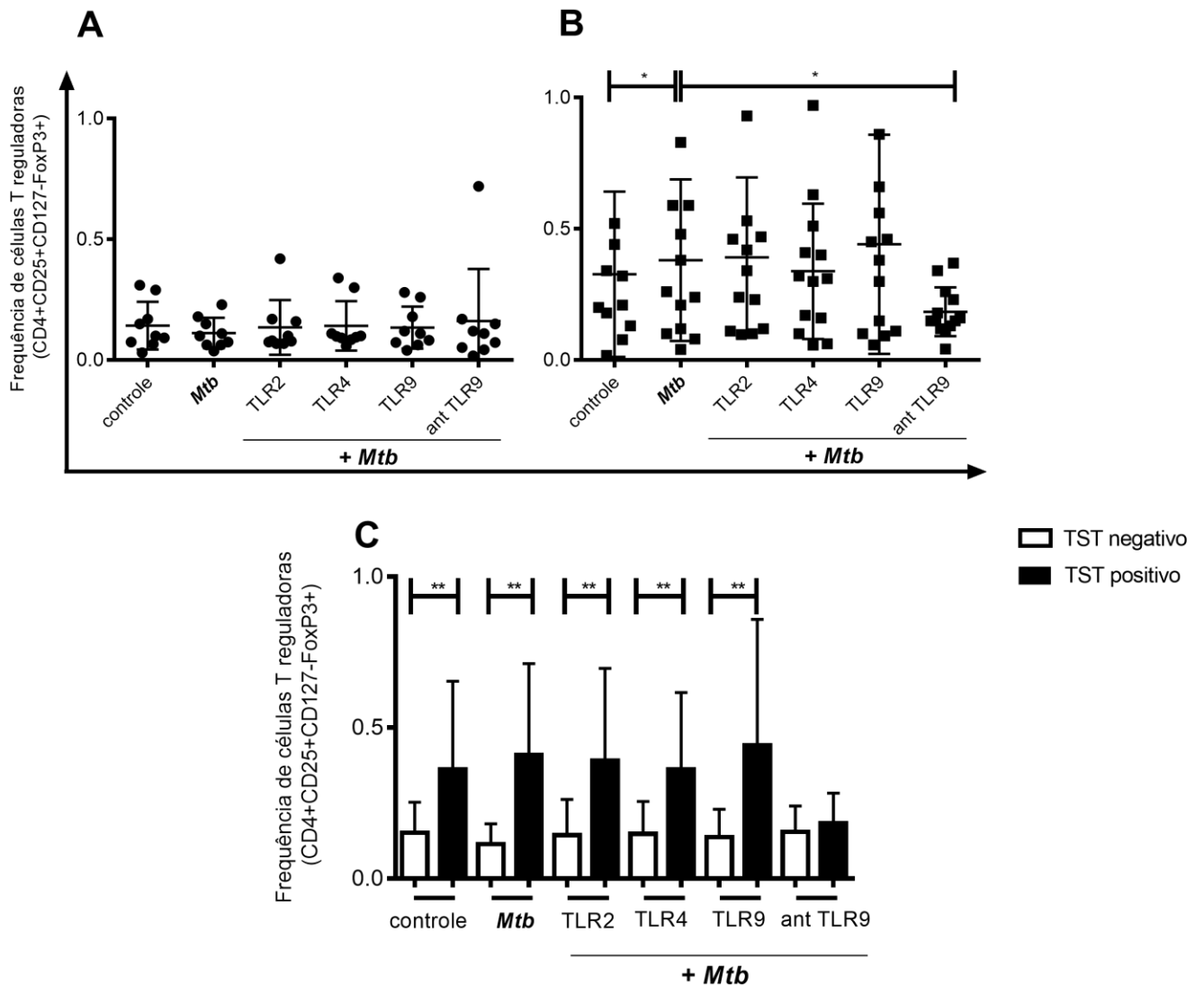


Figura 14: Análise fenotípica da frequência de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ (%) nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb*, na presença de agonistas de TLR2, TLR4, TLR9 ou antagonista de TLR9. Análise intragrupos: A) Grupo TST- (n=9); B) Grupo TST+ (n=10). C) Análise intergrupos. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. * Os valores de p<0,05 foram significantes.

5.2.5 Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura infectadas com *Mtb* após modulação com TLRs

Para conseguirmos mais respostas acerca da influência de moduladores de TLR2, TLR4 e TLR9 sobre a atuação de células Tregs e monócitos/macrófagos na infecção pelo *Mtb*, decidimos dosar, no sobrenadante das culturas realizadas, as citocinas IL10, IL17, TGF- β e IFN- γ .

Considerando cada citocina separadamente, iniciaremos com TGF- β (Fig 15A). Na análise intragrupos, não obtivemos diferença significativa em nenhum dos grupos. Já na análise intergrupos, observamos resultado significativo para o agonista de TLR2 entre os grupos ($p=0,03$), na qual o grupo TST- apresentou maior dosagem. O TST- apresentou maior dosagem de TGF- β em relação ao TST+ em todas as condições presentes na cultura. Já na avaliação da citocina IL10, somente na análise intergrupos foi obtido resultado expressivo (Fig15B). Na estimulação com antagonista de TLR9 a quantificação de IL10 foi maior no grupo TST+ ($p=0,03$) do que no TST- e essa dosagem aumentada também se reflete nas demais condições de cultura (controle, *Mtb* e estímulos com agonistas associados à infecção).

Para a citocina IL17, resultados significativos tanto na análise intragrupo como intergrupos foram obtidos (Fig15C). No grupo TST+ encontramos diferenças entre a infecção e os estímulos com agonista e antagonista de TLR9 ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente), nas quais os estímulos e a infecção conjuntamente, promoveram maior quantidade de IL17 que apenas a infecção por *Mtb*. Já na avaliação intergrupos, a presença da citocina foi maior no grupo TST+ tanto no controle da cultura ($p=0,03$) quanto nos estímulos com TLR4 ($p=0,01$), TLR9 ($p=0,01$) e cloroquina ($p=0,01$).

A citocina IFN- γ também foi avaliada (Fig 15D). Na observação intragrupo, apenas o grupo TST- apresentou resultados significantes. Nesse, a estimulação com TLR2 ($p=0,03$) e TLR4 ($p=0,03$) promoveu maior dosagem que a condição controle, enquanto que o estímulo com cloroquina induziu menor dosagem de IFN- γ que TLR2 ($p=0,02$), TLR4 ($p=0,005$) e *Mtb* sozinho ($p=0,01$). Na análise intergrupos, apesar da maior quantificação de IFN- γ no grupo TST+, apenas na condição de estímulo com antagonista de TLR9 encontramos significância estatística ($p=0,009$) entre os grupos TST+ e TST-.

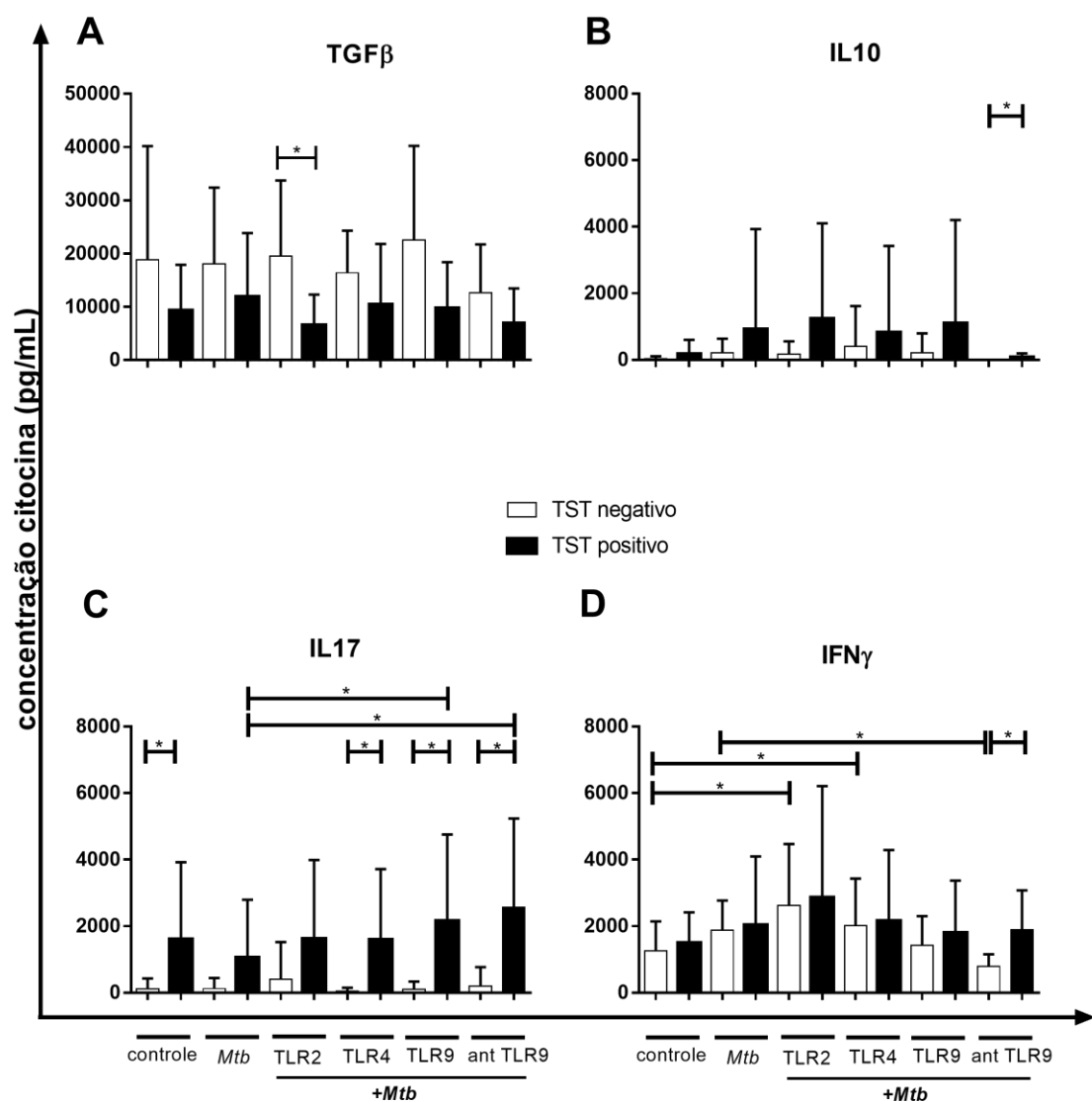


Figura 15: Dosagem de citocinas TGFβ, IL10, IL17 e IFNγ (pg/ml) nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb*, na presença ou ausência de agonistas de TLR2, TLR4, TLR9 e antagonista de TLR9. Análises intra e intergrupos – grupo TST- (n=9) e grupo TST+ (n=10). Análise de A) TGFβ; B) IL10; C) IL17 e D) IFNγ. As barras de erros-padrão de cada grupo estão indicadas nos gráficos. * Os valores de p<0,05 foram significantes.

6 DISCUSSÃO

Ao compararmos indivíduos TST-, TST+ e pacientes com TB, observamos que a frequência de monócitos inflamatórios (CD14⁺ HLA-DR⁺) co-expressando os receptores CD16, TLR2, TLR4 ou TLR9 (constitutivamente) foi significativamente maior nos grupos TST+ e TB quando comparados ao grupo TST-. Ao analisarmos a correlação entre frequência desses monócitos e o resultado do TST/PPD, observamos a existência de dois subgrupos dentro do grupo TST+, o que nos levou a subdividir o grupo TST+ com base nos valores de TST/PPD em: alta resposta (TST+AR) e baixa resposta (TST+BR). Ao reanalisarmos as frequências de monócitos nos grupos TST-, TST+BR (TST/PPD entre 10 e 15 mm), TST+AR (TST/PPD ≥ 15 mm) e pacientes com TB, observamos que indivíduos TST- e TST+BR se assemelhavam, no que se refere a frequência de monócitos (CD14⁺HLA-DR⁺) expressando CD16, TLR2, TLR4 e TLR9. A mesma similaridade foi observada entre indivíduos TST+AR e paciente com TB, sugerindo que indivíduos TST+AR pudessem ser de fato indivíduos LTBI. Desta forma, os indivíduos TST+BR não serão considerados no estudo, sendo comparados os grupos TST+ (TST+AR/LTBI) e TST- (controle saudável), daqui para frente.

Análise de monócitos presentes no sangue periférico de indivíduos TST+ e TST- mostra que monócitos inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺) foram significativamente maior no primeiro grupo, provavelmente por serem estes indivíduos já sensibilizados contra antígenos micobacterianos. Os monócitos CD16⁺ são considerados proinflamatórios por serem mais eficientes do que os monócitos CD16⁻ na produção de TNF- α , IL6 e IL10 em resposta a moléculas associadas a padrões microbianos (BELGE et al., 2002; ZHU et al., 2016; ZIEGLER-HEITBROCK, 2007). Os resultados acumulados nas últimas décadas sugerem que a subpopulação de monócitos CD16⁺ se expande em muitos tipos diferentes de doenças, principalmente nas de caráter infeccioso ou inflamatório (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011; ZHU et al., 2016). Pacientes com TB pulmonar apresentam uma frequência de monócitos circulantes CD14^{Hi}CD16⁺ e CD14^{Lo}CD16⁺ significativamente maior do que pessoas sem a doença ativa

(TST- e TST+)(DIRIX et al., 2018; SAKHNO et al., 2015). Paralelamente, foi demonstrado que monócitos CD16⁺ infectados com *M. tuberculosis* produzem mais TNF- α e menos IL10 quando comparados a células CD16⁻ (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011). Apesar de nossos resultados sugerirem que indivíduos com TST ≥ 15 mm (LTBI) apresentem uma maior similaridade com pacientes TB do que com pessoas TST-, dados de alguns grupos de pesquisa (DIRIX et al., 2018) são contrários aos nossos achados. Apesar de Castaño e colaboradores (2011), relatarem uma semelhança entre pessoas TST- e TST+ e uma discordância destes com casos de TB, o ponto de corte de TST utilizado por estes autores foi de TST ≥ 10 mm, para indivíduos que respondem positivamente ao PPD, enquanto o ponto de corte utilizado em nosso estudo para definir esse grupo foi TST ≥ 15 mm. Dirix e colaboradores (2018), também apresentam resultados que discordam dos nossos, só que estes, utilizam o mesmo ponto de corte para TST que nós. O que nos diferencia além dos resultados, é o fato de todos os participantes de nossa pesquisa serem vacinados, e possivelmente, a gravidade da doença entre os pacientes nos dois estudos, também não se assemelham. Por outro lado, outros autores não encontraram diferenças na frequência de monócitos CD14^{Lo}CD16⁺ e CD14^{Lo}CD16⁺HLA⁺⁺ entre pacientes com TB e indivíduos TST- (BARCELOS et al., 2006; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011). Existem relatos na literatura de indivíduos TST+ apresentando níveis de monócitos CD14^{Hi}CD16⁺ significativamente maior quando comparados com pacientes com TB e controles TST- (BARCELOS et al., 2008; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011). Tendo inclusive, esses autores sugeridos que os monócitos CD16⁺ participam de mecanismos imunes protetores inatos contra *M. tuberculosis* em indivíduos TST+.

Quanto a expressão de TLRs em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, sabemos que a sinalização de TLR tem envolvimento importante na regulação da resistência do hospedeiro ao *Mtb* (BAFICA et al., 2005; QUESNIAUX et al., 2004), sendo TLR2, TLR4, TLR9, os receptores já associados ao reconhecimento de *Mtb* (HOSSAIN; NORAZMI, 2013; KAY; SCOTLAND; WHITEFORD, 2014; MORTAZ et al., 2015). Aumento significativo na expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 em monócitos foi observado tanto em pacientes com TB ativa quanto nos indivíduos TST+ alta resposta (≥ 15 mm), quando comparados aos grupos TST- (PPD > 10 mm) e TST+

baixa resposta (TST entre 10 e 15 mm). Infecção ativa ou latente, poderia relacionar a maior expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 nos grupos supracitados. Esses resultados confirmam dados de outros estudos, mas também discordam de outros existentes (HOSSAIN; NORAZMI, 2013; KAY; SCOTLAND; WHITEFORD, 2014; MORTAZ et al., 2015), uma vez que devido a existência de polimorfismos em TLRs (WU et al., 2018), principalmente, em seres humanos, muitas questões ainda não foram elucidadas.

Monócitos de sangue periférico humano e macrófagos do tecido pulmonar ou intestinal expressam TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR5 (ZAREMBER; GODOWSKI, 2002). TLR1, TLR2 e TLR4 são normalmente expressos por linfócitos, células mielóides e pneumócitos tipo II de granulomas de pacientes com TB, enquanto a expressão de TLR9 é restrita a macrófagos e linfócitos (FENHALLS et al., 2003). Estes autores demonstraram que TLR3 e TLR5 são expressos exclusivamente em macrófagos alveolares e que a expressão de TLR2 e IL4 estava inversamente correlacionada. O que sugere que os padrões de expressão de TLR podem afetar o perfil da resposta imune local do hospedeiro e da imunidade celular (FENHALLS et al., 2003). Em indivíduos saudáveis, macrófagos alveolares, quando comparados a monócitos do sangue periférico, apresentam uma diminuição na expressão de TLR2, e um aumento significativo da expressão de TLR9. Já a expressão de TLR4 na superfície celular de macrófagos alveolares e de monócitos do sangue é baixa e semelhante entre os dois tipos celulares. Esses achados sugerem que a capacidade das células imunes de reconhecer patógenos infecciosos ou partículas nocivas pode ser compartimento-específico (JUAREZ et al., 2010).

As mudanças na expressão de TLR e/ou no seu estado de ativação podem ser utilizadas como marcadores do estado imunológico de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e de seus contatos (MORTAZ et al., 2015). A distribuição de TLR em granulomas de TB indica que TLR1, TLR2 e TLR4 são expressos em células imunes e células não imunes; no entanto, TLR9 só é detectável nas células imunes (ROOK; DHEDA; ZUMLA, 2005). Nos seres humanos, a expressão de TLR9 é principalmente restrita a células B e células dendríticas plasmacitóides, enquanto que nos camundongos a expressão também inclui monócitos, macrófagos e todas as subpopulações de células

dendríticas. Durante a ativação de células humanas, TLR9 também pode ser encontrado em monócitos, neutrófilos e células T CD4 (EHRlich et al., 2017; HOLTICK; SCHEULEN; BERGWELT-BAILDON, 2011; VOLLMER; KRIEG, 2009). Um estudo com células T humanas mostrou que TLR9 pode ser detectado em células T reguladoras secretoras de IL10 induzidas na presença de 1- α -25-diidroxitamina D3 (URRY et al., 2009). Como mencionado anteriormente, vimos maior expressão de TLR9 em indivíduos TST+ quando comparado com o grupo TST-. No entanto, estudos da expressão intracelular e extracelular de TLR9 tanto constitutivo quanto após estímulo com DNA bacteriano (CpG), mostram que a expressão de TLR9 é similar e pouco expressiva em macrófagos alveolares e monócitos de pessoas saudáveis (TST positivas e negativas) (JUAREZ et al., 2010), porém encontramos maior expressão desse marcador nos indivíduos que foram infectados pelo *Mtb*, independente do desenvolvimento da doença.

Nos seres humanos, a associação do polimorfismo de TLRs com susceptibilidade à TB ainda não foi totalmente esclarecida (MORTAZ et al., 2015). Estudos com humanos mostram que polimorfismos de TLR2 e TLR4 estão associados a uma susceptibilidade aumentada à infecções microbianas, possivelmente por alterar a resposta Th1/Th2 (KANG; LEE; CHAE, 2002; MORTAZ et al., 2015; SCHWARTZ et al., 2000). Com relação a associação entre os diferentes polimorfismos no gene TLR2 humano e o aumento da susceptibilidade à TB os dados são ainda contraditórios (BISWAS et al., 2009; THUONG et al., 2007; VELEZ et al., 2010; WU et al., 2018; XUE et al., 2010; ZHANG et al., 2013).

Os polimorfismos genéticos em TLR4 já foram correlacionados a uma maior susceptibilidade e gravidade na TB pulmonar em uma população asiática na Índia (NAJMI et al., 2010), mas não em pacientes indianos ou chineses com TB na Gâmbia (KHOR et al., 2007; WU et al., 2018; XUE et al., 2010). Essa discrepância pode ser devido a dinâmica da interação patógeno-hospedeiro entre fenótipos genéticos e patogênicos (KHOR et al., 2007).

Até o presente momento, o envolvimento de TLR2, TLR4 e TLR9 na infecção por *Mtb* ainda não foi totalmente elucidado. Por isso, buscamos avaliar a expressão desses receptores em monócitos do sangue periférico e, posteriormente, sua

modulação na cultura de sangue total infectada com *Mtb* na presença de agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9 ou de antagonista TLR9. A expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 nos monócitos (CD14⁺HLA-DR⁺) do sangue periférico de indivíduos TST+ e TST- de nossa pesquisa, mostrou-se diferente entre os grupos na primeira etapa, o que não se repetiu na segunda etapa, possivelmente, pelo n extremamente reduzido nesse último momento. Essa ausência de diferença entre os grupos também foi observada na cultura com e sem *Mtb*, havendo apenas um aumento significativo da expressão no grupo TST+ em relação ao antes e depois da infecção, o que não corrobora com estudos anteriores.

Segundo Juarez e colaboradores (2010), a expressão de TLR2 na análise por citometria de fluxo, após estimulação com Pam3Cys (agonista de TLR2), diminui em monócitos e em macrófagos alveolares permanece inalterada, enquanto que TLR4 mostra aumento de expressão em resposta a LPS em monócitos do sangue e macrófagos alveolares. Tomados em conjunto, esses resultados indicam uma regulação diferencial da expressão de TLR2 e TLR4 mediada por ligante e tipo celular específico (JUAREZ et al., 2010). No entanto, alguns autores mostraram que sob condições como trauma ou um estímulo direto por ligante, há uma redução da expressão de TLR9 em monócitos (HEFTRIG et al., 2017; JUAREZ et al., 2010)

Neste mesmo experimento, quando observamos a atividade microbida nesses grupos, constatamos uma menor atividade microbida no grupo TST+ na presença ou ausência dos agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9. Porém, na presença do antagonista de TLR9, a cloroquina, verificamos um aumento da capacidade microbida no grupo TST+, a níveis semelhante a encontrada no TST-. Essa menor atividade microbida do grupo TST+, pode ser explicada pela maior frequência de monócitos CD16⁺, que seria intensificada pela infecção com *Mtb*, independente da presença de estímulo dos agonistas. A presença de TLR9 em monócitos humanos ocorre quando estas células estão ativadas (EHRlich et al., 2017). A presença de monócitos imaturos, com pouca capacidade fagocítica e que poderiam ainda estar entrando em apoptose, justificariam a menor capacidade microbida observada e a falta de ação pelos agonistas.

Além disso, o grupo TST+ apresentou resultados semelhantes a pacientes com TB. Esses pacientes têm uma frequência aumentada de monócitos CD14^{Hi}CD16⁺ e CD14^{Lo}CD16⁺ circulantes em comparação com controles saudáveis (SÁNCHEZ et al., 2006), sendo que estes monócitos CD16⁺ apresentam diminuição da expressão de marcadores relacionados à maturação, diferenciação e função de fagócitos mononucleares como CD11b, CD36, CD64, CD68 CD80, CD86, CCR2 e NSE (ARCILA et al., 2007; CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011; SÁNCHEZ et al., 2006). Células CD16⁺ em pacientes com TB não se diferenciam em macrófagos, produzem níveis mais altos de TNF- α , mais baixos de IL10 e sofrem um aumento de morte celular em resposta à infecção por *M. tuberculosis*. Esses resultados sustentam que os monócitos CD16⁺ estão em estágio de menor maturação ou diferenciação (maturação/diferenciação) ou, alternativamente, que esses monócitos possam ser na verdade precursores de células dendríticas ao invés de macrófagos (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011).

É provável que o receptor TLR9 atue em células dendríticas derivadas de células monocíticas (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011), e que sob a influência desse receptor, células dendríticas, especialmente as plasmacitóides (pDC) (DURAND; SEGURA, 2015), participem da resposta imune na infecção por *Mtb* e da modulação com agonista e antagonista de TLR9. As DCs humanas consistem em dois subconjuntos, mDCs e pDCs (DURAND; SEGURA, 2015; LANDE; GILLIET, 2010). As mDCs, estimuladas por TLR2-6 e TLR8, induzem as células efectoras Th1, enquanto que as pDCs, cuja maturação ocorre por TLR7 e TLR9 estão associadas à indução e manutenção de condições imunossupressoras pela secreção de Indolamina 2,3-dioxigenase, IL3, expressão de ICOS-L, CD40L, em associação à Treg (JANKE et al., 2006; OGATA et al., 2012). Embora as pDCs secretem grandes quantidades de IFN do tipo 1, induzam e melhorem a resposta antitumoral de células T CD8⁺ e células NK, e desempenhem papéis importantes na imunidade antiviral (DURAND; SEGURA, 2015; LANDE; GILLIET, 2010), elas possuem uma capacidade imunomoduladora mais fraca como células apresentadoras de antígeno do que as DC convencionais. Sabe-se também que as pDCs têm um importante papel imunossupressor na

autoimunidade tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos (NAGASE et al., 2017; OGATA et al., 2012).

Essa hipótese é corroborada por nossos resultados com relação a frequência de Tregs obtidas por nós nas culturas de sangue total infectadas com *Mtb* e moduladas por agonistas e antagonista. Mostramos que o contato prévio com o bacilo (especialmente na infecção latente) pode levar a um aumento da frequência de Treg em indivíduos TST+, o qual também é favorecido pelo estímulo com agonista de TLR9. No entanto, o uso da cloroquina (antagonista de TLR9), fez com que a frequência dessas células fosse reduzida a níveis semelhantes à do grupo TST-, sugerindo que o receptor TLR9 pode estar participando indiretamente da ação das células Tregs (elas normalmente não expressam esse receptor) (EHRlich et al., 2017; HOLTICK; SCHEULEN; BERGWELT-BAILDON, 2011; VOLLMER; KRIEG, 2009) e com isso, da resposta imune ao *Mtb*. Estes dados são condizentes com o observado para atividade microbicida, visto que a presença de células Tregs pode reduzir a capacidade microbicida devido a sua ação imunossupressora.

Uma possível forma de regulação de Treg por pDC, poderia ser explicada pelo receptor coestimulador induzível por TCR (ICOS), membro da superfamília CD28 (NAGASE et al., 2017), conhecido por induzir a secreção de IL10 e TGF- β em células T (JANKE et al., 2006). Estudos da atividade imunossupressora de células Tregs mostram que Treg ICOS+ exibem uma forte atividade imunossupressora *in vitro* em camundongos e humanos em combinação com ICOS-L presente em pDCs (ITO et al., 2008; LANDE; GILLIET, 2010; NAGASE et al., 2017). Ito e colaboradores mostraram que após a maturação mediada por agonistas de TLR9, pDCs, purificadas a partir de PBMCs com a expressão fortemente regulada de ICOS-L, induziam a diferenciação de células Tregs ICOS+ a partir de células TCD4+ virgens (ITO et al., 2008).

No entanto, para Bafica e colaboradores (2005), o DNA de *Mtb* é, de fato, um estímulo potente para a produção de citocinas próinflamatórias dependentes de TLR9 por DCs e macrófagos. Estes autores demonstraram, utilizando modelos experimentais murinos, que as respostas *in vitro* dessas células contra micobactérias vivas são parcialmente dependentes de TLR9. Adicionalmente,

mostraram que TLR9 desempenha um papel importante na regulação das respostas Th1 induzidas por micobactérias durante a infecção micobacteriana *in vivo*. O que reforça a hipótese sobre a participação de TLR9 na resposta imune à *M. tuberculosis* e sua colaboração na resistência do hospedeiro à infecção (BAFICA et al., 2005) em modelos experimentais murinos.

Esses efeitos antagônicos do agonista de TLR9 podem ser dose-dependentes, uma vez que a ligação de TLRs pode tanto ativar quanto reduzir a resposta imune. Evidências experimentais mostram que o ligante de TLR9, CpG, quando presente em concentrações mais baixas inicia uma resposta mediada por Th1, ao passo que a sinalização de TLR9 em resposta a altas concentrações de CpG podem induzir uma resposta regulatória (BABAN et al., 2009; CAMPBELL et al., 2014; EHRLICH et al., 2017; WAIBLER et al., 2008; XIN et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados em diferentes estágios de doenças inflamatórias, incluindo asma, doenças infecciosas e modelos de câncer (EHRLICH et al., 2017; HOLTICK; SCHEULEN; BERGWELT-BAILDON, 2011; VOLLMER; KRIEG, 2009). Assim, a ligação de CpG do bacilo de Koch ao TLR9 do hospedeiro pode produzir efeitos diferentes na presença de inflamação e durante o estado estacionário da doença (EHRLICH et al., 2017).

Com relação a frequência de Tregs em pacientes com LTBI e a influência de receptores Toll nessas células os dados são escassos (BABU et al., 2010). Estudos mostraram que as células Tregs CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ estão elevadas em TB ativa, em comparação com controles não infectados (GUYOT-REVOL et al., 2006; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006) e indivíduos com LTBI (HOUGARDY et al., 2007; MARIN et al., 2010). No entanto, níveis elevados de Tregs circulantes foram encontrados anteriormente em pacientes com TB ativa (GUYOT-REVOL et al., 2006; HOUGARDY et al., 2007; MARIN et al., 2010; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006); porém, Wergeland e colaboradores (2011) demonstraram que Treg CD127⁻ está elevada no estágio latente de infecção. Nossos resultados demonstram também uma maior frequência de Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺) no grupo TST+ (PPD ≥ 15mm, LTBI), em relação aos indivíduos TST-. Também observamos que o bloqueio do receptor TLR9, ainda que não exclusivamente, devido a ação da cloroquina é capaz de reduzir

essa frequência, e com isso, diminuir a ação supressora sobre a resposta protetora Th1.

Na tentativa de melhor compreender nossos resultados, finalizamos nossa investigação com a determinação da concentração de citocinas (TGF- β , IL10, IL17 e IFN- γ) presentes no sobrenadante das culturas de sangue total infectadas e estimuladas com TLRs. Observamos que o grupo TST- produziu concentrações de TGF- β superiores as observadas no grupo TST+ e que estimulação com TLR2 favorece a produção de TGF- β na análise intergrupos. Porém, mesmo efeito não foi encontrado para as citocinas IL10 e IL17, que tiveram maior dosagem no grupo TST+ em relação ao grupo TST-, especialmente, pós-estimulação com o antagonista de TLR9. Já para o IFN- γ , a presença de TLR2 e TLR4 promoveu uma produção significativamente maior dessa citocina no grupo TST- em relação ao controle. Uma similaridade entre os grupos do estudo foi observada, exceto pós-estimulação com cloroquina, a qual induziu uma maior produção de IFN- γ no grupo TST+.

Esses dados nos levam a sugerir que em indivíduos TST- a participação de células Tregs (TGF- β /IL10), Th17 (TGF- β /IL17) e Th1 (IFN- γ), sofreram pouca ou nenhuma contribuição por parte da infecção e/ou estimulação com os agonistas dos TLRs estudados. Já para o grupo TST+ (PPD ≥ 15 mm), observamos que existe certa influência da infecção e do estímulo dos agonistas nos tipos de respostas presentes nesse grupo. Apesar da dosagem da citocina Th1 ser similar ao do grupo TST-, indivíduos TST+ apresentaram um aumento significativo na frequência de células Tregs e de citocina IL17 (Th17). Porém, quando culturas de células de sangue total de indivíduos TST+ foram estimulados com antagonista de TLR9 ocorreu a manutenção da resposta Th1 e um aumento discreto de células Th17; por outro lado, a frequência de células Tregs apresentaram uma redução significativa, o que é condizente com nossos dados de frequência dessas células.

IL10 parece ter um papel bastante importante na TB, seja na doença ativa ou na infecção TB latente. A produção de IL10 pode ser feita por tipos celulares, como por exemplo, macrófagos e células Tregs. Em humanos, uma produção elevada

de IL10 por macrófagos em resposta desencadeada por TLR *in vitro* foi associada à tendência de desenvolver TB progressiva primária (AWOMOYI et al., 2002). De fato, uma redução das respostas de células T mediada por IL10 pode afetar a integridade do granuloma e predispor à cavitação pulmonar, o que poderia facilitar a transmissão das bactérias para novos hospedeiros (ETNA et al., 2014a).

As células T reguladoras, cujo desenvolvimento depende do TGF- β e da expressão do fator de transcrição FoxP3, também são importantes na imunidade contra a TB devido ao controle de inflamação excessiva. Na verdade, foi demonstrado que Tregs são mais frequentes em pacientes com TB ativa do que em pacientes com infecção latente (MARIN et al., 2010) ou em indivíduos saudáveis que respondem à tuberculina (GARG et al., 2008). Durante a infecção de TB, a expansão das células Th17 e Tregs, bem como a conversão de Treg em produtores de IL17, dependem da expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e FoxP3, cujos níveis relativos são controlados por TGF- β , IL23 e IL6 (AFZALI et al., 2010). Esses linfócitos T reguladores têm múltiplos efeitos inibitórios: supressão direta da atividade das células T CD4+ através da secreção de IL10 ou expressão de TGF- β ligado à membrana; desativação de células apresentadoras de antígenos, etc (SHAFIANI et al., 2010). Nossos resultados de frequência de Treg e dosagem de IL10 são sugestivos de produção dessa citocina por células Tregs e a presença dessas células pode estar contribuindo diretamente para a redução da atividade microbicida de fagócitos. Assim, a presença de Tregs nos órgãos infectados é importante para equilibrar as respostas imunes protetoras e nocivas, limitando a intensidade da resposta das células T às bactérias (ETNA et al., 2014a). No entanto, a ativação excessiva de Tregs pode exercer um papel negativo, uma vez que se acredita que essas células possam mediar o estabelecimento da infecção persistente e a reativação da TB latente (KAUFMANN, 2013).

Segundo Babu e colaboradores (2010), não há diferença na expressão de citocinas Th1 entre os indivíduos TST+ e TST-, tanto pré quanto pós-estimulação com antígenos-específicos. O mesmo foi observado por nós em relação a produção de IFN- γ . Embora a indução de produção de IFN- γ antígeno-específica

seja geralmente uma marca registrada da infecção por *Mtb*, foi previamente demonstrado que não foram observadas diferenças significativas na expressão de IFN- γ quando indivíduos saudáveis ou potencialmente expostos são separados com base na reatividade de TST (LIEBESCHUETZ et al., 2004; SCRIBA et al., 2008). A ausência de diferenças na resposta Th1 entre os dois grupos no estudo de Babu e colaboradores (2010), sugere que o desenvolvimento da infecção latente é independente da resposta Th1 (BABU et al., 2010).

Estes autores também examinaram a indução de resposta Th17 em indivíduos TST + e TST-. A produção de IL17, uma potente citocina inflamatória induzida pela infecção por *Mtb*, é dependente da presença de IL1 β , IL6, TGF- β , IL21 e IL23 (BABU et al., 2010). Em resposta a infecção pelo *Mtb*, IL17 é dependente da presença de IL23 (KHADER; COOPER, 2008; MCGEACHY; CUA, 2008), e a diferenciação Th17 necessita da indução do fator de transcrição ROR γ t (MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008). Embora as células Th17 não sejam tão importantes quanto as células Th1 na proteção contra a infecção primária de *Mtb*, IL17 parece ser crítica na indução de resposta de memória específica ao *Mtb* e mediação de proteção contra infecções por desafio e na vacinação (DHEDA et al., 2008; KHADER et al., 2005; KHADER; COOPER, 2008). Além disso, o eixo IL23-IL17 é considerado importante na resposta imune humana à TB (DHEDA et al., 2008; SCRIBA et al., 2008). Nossos dados demonstrando que indivíduos TST+ não são influenciados pela IL17, discordando do observado por Babu e colaboradores. Além do mais, estes autores acreditam que alterações significativas na produção de IL17 e IL23 por eles observadas, sugerem que a falta de regulação positiva de Th17 é uma característica principal da positividade de TST. Além disso, que a expressão diminuída de ROR γ t indica que a falta de indução de Th17 pode ser mediada no nível da transcrição (BABU et al., 2010).

Sabe-se que Tregs são reguladores da resposta Th17 em camundongos (BETTELLI et al., 2006; ZHOU et al., 2008). De fato, a regulação recíproca de Th17 e Treg é uma característica estabelecida da diferenciação de células T e é regida pela presença de citocinas específicas (BETTELLI et al., 2006; ZHOU et al., 2008). TGF- β é um indutor conhecido de Treg, bem como de células Th17 (BETTELLI et al., 2006; MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008; YANG et al., 2008;

ZHOU et al., 2008). A presença de citocinas acessórias IL6 ou IL21, no entanto, desvia o desenvolvimento de células Th17 às custas da linhagem Treg (BETTELLI et al., 2006; KORN et al., 2007; MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008; YANG et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Esta regulação interdependente de Th17 e Treg é menos bem caracterizada em seres humanos, do que a associação da regulação positiva Th17 e supressão de Treg que foi descrita em apenas alguns distúrbios autoimunes e inflamatórios humanos (CHENG et al., 2008; NISTALA et al., 2008). Dados de um estudo com infecção latente (definida pela positividade de TST) mostrou a existência de uma clara relação inversa entre células Th17 e Tregs (que nós não conseguimos confirmar em nosso estudo) e que a depleção de células TCD4⁺CD25⁺ inverte a inibição de células Th17 *Mtb*-específicas em TST+, mas não em indivíduos TST- (BABU et al., 2010). Nós por outro lado, não depletamos Tregs, mas com o uso do antagonista para TLR9 conseguimos reduzir o número dessas células, o que favoreceu ainda mais a produção de IL17.

Na última década, vários estudos demonstraram que a indução recíproca de respostas celulares Th1 e Th17 desempenham um papel importante no estabelecimento da imunidade protetora contra a TB (GRIFFITHS et al., 2011). Em geral, a proteção contra *Mtb* é dependente de uma resposta Th1 robusta através da secreção de IFN- γ por células TCD4⁺ antígeno-específicas; no entanto, estudos recentes enfatizam a importância da resposta Th17 na imunidade protetora contra a infecção pelo *Mtb* (CHATTERJEE et al., 2011; GOPAL et al., 2012; TORRADO; COOPER, 2010). Assim, a compreensão do equilíbrio entre as respostas Th1 e Th17 durante a infecção (KHADER; COOPER, 2008) e a identificação de novas proteínas que induzam simultaneamente as respostas imunes Th1 e Th17 são cruciais para o desenvolvimento de vacinas eficazes (CHOI et al., 2015).

Embora a vacina BCG induza uma resposta Th1 robusta, esta vacina não induz uma proteção eficaz contra um desafio com *Mtb* (CHOI et al., 2015; KHADER; COOPER, 2008; MAJLESSI et al., 2006). Além das células Th1, acredita-se que as células Th17 desempenhem um papel crítico no estabelecimento de uma resposta imune protetora ideal contra *Mtb* virulento (GOPAL et al., 2014). Os linfócitos Th1 produzem várias citocinas, incluindo IFN- γ , que promove a

ativação de macrófagos estimulando a maturação do fagossoma e, os linfócitos Th17, que estão envolvidos na fase inicial da defesa do hospedeiro, produzem citocinas essenciais para o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção (GRIFFITHS et al., 2011). A existência de respostas diferenciais pelas células Th1 e Th17 podem estar relacionadas à taxa de replicação bacteriana e à carga antigênica (LAGRANDERIE et al., 2010; LEE et al., 2008). Assim, os antígenos de *Mtb* que induzem respostas de células Th1 e Th17 sem expansão de células Tregs podem ser considerados candidatos vacinais importantes (CHOI et al., 2015). Da mesma forma, estímulos que promovam o desfecho podem ser úteis como adjuvantes no controle da doença, evitando a (re)ativação e/ou até mesmo servir como vacina.

7 CONCLUSÃO

Na avaliação da influência dos agonistas e antagonista dos receptores do tipo *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9), na frequência de células T reguladoras e monócitos, na atividade microbicida e dosagem de citocinas IL10, IL17, TGF β e IFN γ , em sangue periférico e em culturas de sangue total desafiadas com o bacilo de Koch, em indivíduos com infecção latente pelo *Mtb* (TST+) em relação ao controle negativo (TST-), observamos uma maior frequência de monócitos/macrófagos (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺ e CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺), no sangue periférico de indivíduos LTBI/TST+. Neste grupo a correlação entre a frequência e a enduração do teste tuberculínico foi positiva para todos os fenótipos testados, o que nos possibilitou identificar e sugerir os indivíduos com TST \geq 15mm, como sendo indivíduos com LTBI.

Na ação de agonista de TLR2, TLR4 e TLR9 ou de antagonista de TLR9 na frequência de células Tregs de culturas de sangue total desafiadas com *Mtb*, a maior frequência dessas células no grupo TST+ foi reduzida após o uso de antagonista de TLR9 (cloroquina), que resultou na similaridade entre as frequências dos grupos TST+ e TST-, após esse estímulo. Similaridade também encontrada para a frequência de monócitos/macrófagos (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR2⁺HLA-DR⁺, CD14⁺TLR4⁺HLA-DR⁺ e CD14⁺TLR9⁺HLA-DR⁺), nas mesmas culturas.

Quanto a influência da infecção por *Mtb* nas culturas, a atividade microbicida foi menor no grupo TST+. Em culturas de sangue total desafiadas com *Mtb* e moduladas com agonista de TLRs (2, 4 e 9) ou antagonista de TLR9, houve redução da atividade no grupo TST+, durante estimulação com agonista de TLR2, e nesses mesmos indivíduos, no estímulo com antagonista de TLR9 observou-se a restauração da atividade microbicida a nível similar ao grupo TST-. Quanto a dosagem de citocinas nas mesmas culturas, houve maior produção de IL10, IL17 e IFN γ no grupo TST+, especialmente, após modulação com cloroquina, em relação ao grupo TST-.

Nossos dados indicam que indivíduos LTBI/TST+ (TST \geq 15mm) apresentam maior frequência de monócitos no sangue periférico, bem como uma frequência significativamente maior de células Tregs e monócitos e uma redução na atividade microbicida em culturas de sangue total infectadas com *Mtb*. A produção de citocinas em sobrenadantes de culturas de sangue total, sugerem um equilíbrio na resposta imune em indivíduos LTBI, que pode ser mediado por células Th17, Th1 e Treg. O uso da cloroquina poderia favorecer a resposta pró-inflamatória pelo perfil de citocinas IL17, IL10 e IFN γ apresentados, sendo necessário novos experimentos com a utilização de anticorpo bloqueador de TLR9 e a dosagem de IL17F, para a confirmação. Em suma, LTBI difere do controle TST- pela maior frequência de Tregs e monócitos e pela menor atividade microbicida, ao passo que o bloqueio de TLR9, pelo uso da cloroquina, resultou na redução da frequência de células Tregs, maior produção de IL17, IFN γ e IL10 e na melhora da atividade microbicida de LTBI em relação ao TST-.

8 REFERÊNCIAS

ABEL, B. et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 3155–3162, 2002.

AFZALI, B. et al. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 159, n. 2, p. 120–130, fev. 2010.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, n. 8, p. 675–680, 2001.

ALIPRANTIS, A. O. Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 736–739, 30 jul. 1999.

AMERICAN THORACIC SOCIETY, C. FOR D. C. AND P. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. S221–S247, 9 jun. 2000.

ARCILA, M. L. et al. Activation of apoptosis , but not necrosis , during Mycobacterium tuberculosis infection correlated with decreased bacterial growth : Role of TNF- α , IL-10 , caspases and phospholipase A2 q. **Cellular Immunology**, v. 249, p. 80–93, 2007.

AWOMOYI, A. A. et al. Interleukin-10, Polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and Susceptibility to Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1808–1814, 15 dez. 2002.

BABAN, B. et al. IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2475–2483, 15 ago. 2009.

BABU, S. et al. Regulatory T Cells Modulate Th17 Responses in Tuberculin skin test positive (TST+) individuals. **J Infect Dis**, v. 201, n. 1, p. 20–31, 2010.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 19 dez. 2005.

BALBOA, L. et al. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. **Clinical Science**, v. 129, n. 4, p. 319–330, 1 ago. 2015.

BARCELOS, W. et al. Immunophenotyping in Pulmonary Tuberculosis Patients before and after Treatment. v. 50, n. 8, p. 597–605, 2006.

BARCELOS, W. et al. Natural Killer Cell Subpopulations in Putative Resistant Individuals and Patients with Active *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 1, p. 92–102, jul. 2008.

BARRIOS-PAYÁN, J. et al. Extrapulmonary Locations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA During Latent Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 8, p. 1194–1205, 15 out. 2012.

BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–855, 26 dez. 2009.

BAUER, S. et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9237–9242, 31 jul. 2001.

BEAMER, G. L. et al. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 8, p. 5545–50, 15 out. 2008.

BELGE, K.-U. et al. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 7, p. 3536–3542, 2002.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–

238, 11 maio 2006.

BHATT, K.; SALGAME, P. Host Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 4, p. 347–362, 11 jun. 2007.

BISWAS, D. et al. TLR2 polymorphisms, Arg753Gln and Arg677Trp, are not associated with increased burden of tuberculosis in Indian patients. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 1, p. 162, 2009.

BOWDISH, D. M. E. et al. MARCO, TLR2, and CD14 Are Required for Macrophage Cytokine Responses to Mycobacterial Trehalose Dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000474, 12 jun. 2009.

BRASIL. Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 1–30.

BULUT, Y. et al. Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-like Receptor Pathways to Activate Pro-inflammatory Signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 20961–20967, 3 jun. 2005.

CADENA, A. M.; FLYNN, J. L.; FORTUNE, S. M. The Importance of First Impressions: Early Events in Mycobacterium tuberculosis Infection Influence Outcome. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e00342-16-, 4 maio 2016.

CAMPBELL, J. D. et al. A limited CpG-containing oligodeoxynucleotide therapy regimen induces sustained suppression of allergic airway inflammation in mice. **Thorax**, v. 69, n. 6, p. 565–573, jun. 2014.

CAPPELLI, G. et al. Human Macrophage Gamma Interferon Decreases Gene Expression but Not Replication of Mycobacterium tuberculosis: Analysis of the Host-Pathogen Reciprocal Influence on Transcription in a Comparison of Strains H37Rv and CMT97. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7262–7270, 1 dez. 2001.

CARAMALHO, I. et al. Regulatory T Cells Selectively Express Toll-like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 4, p. 403–411, 17 fev. 2003.

CASTAÑO, D.; GARCÍA, L. F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16 + monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 348–360, 2011.

CHAN, J.; FLYNN, J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 1, p. 2–12, jan. 2004.

CHATTERJEE, S. et al. Early Secreted Antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002378, 10 nov. 2011.

CHEN, X. et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. **Clinical Immunology**, v. 123, p. 50–59, 2007.

CHENG, X. et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. **Clinical Immunology**, v. 127, n. 1, p. 89–97, abr. 2008.

CHIFFOLEAU, E. et al. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. **International Immunology**, v. 19, n. 2, p. 193–201, 29 nov. 2006.

CHOI, H.-G. et al. Mycobacterium tuberculosis RpfE promotes simultaneous Th1- and Th17-type T-cell immunity via TLR4-dependent maturation of dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1957–1971, jul. 2015.

COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2243–7, 1 dez. 1993.

COOPER, A. M. et al. Expression of the Nitric Oxide Synthase 2 Gene Is Not Essential for Early Control of Mycobacterium tuberculosis in the Murine Lung.

INFECTION AND IMMUNITY, v. 68, n. 12, p. 6879–6882, 2000.

COOPER, A. M. et al. IFN- γ and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 221–226, maio 2002.

COOPER, A. M. Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 393–422, abr. 2009.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 252–260, 23 maio 2011.

COOPER, A. M.; SOLACHE, A.; KHADER, S. A. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 441–447, ago. 2007.

COURT, N. et al. Partial Redundancy of the Pattern Recognition Receptors, Scavenger Receptors, and C-Type Lectins for the Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7057–7070, 15 jun. 2010.

CRELLIN, N. K. et al. Human CD4⁺ T Cells Express TLR5 and Its Ligand Flagellin Enhances the Suppressive Capacity and Expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8051–8059, 15 dez. 2005.

DAHL, K. E. et al. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 64, n. 2, p. 399–405, fev. 1996.

DEMANGEL, C.; BERTOLINO, P.; BRITTON, W. J. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. **European journal of immunology**, v. 32, n. 4, p. 994–1002, abr. 2002.

DHEDA, K. et al. Gene expression of IL17 and IL23 in the lungs of patients with active tuberculosis. **Thorax**, v. 63, n. 6, p. 566–568, 1 jun. 2008.

DIEL, R.; LODDENKEMPER, R.; NIENHAUS, A. Predictive Value of Interferon- γ Release Assays and Tuberculin Skin Testing for Progression From Latent TB Infection to Disease State. **Chest**, v. 142, n. 1, p. 63–75, jul. 2012.

DIRIX, V. et al. Blood tolerogenic monocytes and low proportions of dendritic cell subpopulations are hallmarks of human tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 5, p. 945–954, maio 2018.

DURAND, M.; SEGURA, E. The known unknowns of the human dendritic cell network. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. March, p. 2–8, 2015.

EHRLICH, A. K. et al. Local delivery of the Toll-like receptor 9 ligand CpG downregulates host immune and inflammatory responses, ameliorating established *Leishmania (Viannia) panamensis* chronic infection. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 3, 2017.

ESMAIL, H.; BARRY, C. E.; WILKINSON, R. J. Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 9–10, p. 514–521, maio 2012.

ETNA, M. P. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 543–551, 2014a.

ETNA, M. P. et al. A human dendritic cell-based in vitro model to assess *Mycobacterium tuberculosis* SO2 vaccine immunogenicity. **ALTEX**, v. 46, n. 4, p. 397–406, 2014b.

FARIDGOHAR, M.; NIKOUEINEJAD, H. New findings of Toll-like receptors involved in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Pathogens and Global Health**, v. 111, n. 5, p. 256–264, 4 jul. 2017.

FENHALLS, G. et al. Associations between Toll-Like Receptors and Interleukin-4 in the Lungs of Patients with Tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 28–38, jul. 2003.

GARG, A. et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-

dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 2, p. 459–469, fev. 2008.

GARTON, N. J. et al. Cytological and Transcript Analyses Reveal Fat and Lazy Persister-Like Bacilli in Tuberculous Sputum. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 4, p. e75, 1 abr. 2008.

GEROSA, F. et al. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 6, p. 1447–1461, 9 jun. 2008.

GETAHUN, H. et al. Management of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. **European Respiratory Journal**, v. 46, n. 6, p. 1563–1576, dez. 2015.

GIACOMINI, E. et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 12, p. 7033–41, 15 jun. 2001.

GIDEON, H. P. et al. Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004603, 22 jan. 2015.

GILL, W. P. et al. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 211–214, 1 fev. 2009.

GOPAL, R. et al. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 364–373, fev. 2012.

GOPAL, R. et al. Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 Infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004099, 15 maio 2014.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. THE B7 FAMILY

REVISITED. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 515–548, abr. 2005.

GRIFFITHS, K. L. et al. Th1/Th17 Cell Induction and Corresponding Reduction in ATP Consumption following Vaccination with the Novel Mycobacterium tuberculosis Vaccine MVA85A. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23463, 26 ago. 2011.

GUILLIAMS, M. et al. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 94–108, 21 fev. 2014.

GUYOT-REVOL, V. et al. Regulatory T Cells Are Expanded in Blood and Disease Sites in Patients with Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, p. 803–810, 2006.

HARGREAVES, C. E. et al. Fcγ receptors: genetic variation, function, and disease. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 6–24, nov. 2015.

HARRIES, A. D.; DYE, C. Tuberculosis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 5 and 6, p. 415–431, abr. 2006.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1123–1132, 2 nov. 2005.

HEFTRIG, D. et al. in Ex Vivo-In Vitro Stimulated Monocytes from Severely Injured Trauma Patients. v. 2017, n. Mhc 2, 2017.

HERNÁNDEZ-PANDO, R. et al. Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection. **The Lancet**, v. 356, n. 9248, p. 2133–2138, dez. 2000.

HIRSCH, C. S. et al. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor β (blastogenesis-macrophage effector function-decorin-latency as. **Immunology**, v. 94, p. 3926–3931, 1997.

HOLTICK, U.; SCHEULEN, M. E.; BERGWELT-BAILDON, M. S. VON. Toll-like receptor 9 agonists as cancer therapeutics. **Expert Opin. Investig. Drug**, v. 20,

n. 3, p. 361–372, 2011.

HORNUNG, V. et al. Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4531–4537, 2002.

HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M.-N. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in Mycobacterium tuberculosis Infection—The Double-Edged Sword? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLOS Medicine**, 2016.

HOUGARDY, J.-M. et al. Regulatory T Cells Depress Immune Responses to Protective Antigens in Active Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 4, p. 409–416, 15 ago. 2007.

HUAMAN, M. A.; DEEPE, JR., G. S.; FICHTENBAUM, C. J. Elevated Circulating Concentrations of Interferon-Gamma in Latent Tuberculosis Infection. **Pathogens and Immunity**, v. 1, n. 2, p. 291, 1 nov. 2016.

ITO, T. et al. Two functional subsets of Foxp3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. **Immunity**, v. 28, n. 6, p. 870–880, 2008.

JANKE, M. et al. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. **Immunology**, v. 118, p. 353–360, 2006.

JUAREZ, E. et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. **Respiratory Research**, v. 11, n. 1, p. 2, 5 dez. 2010.

KAHWATI, L. C. et al. Primary Care Screening and Treatment for Latent Tuberculosis Infection in Adults. **JAMA**, v. 316, n. 9, p. 970, 6 set. 2016.

KANG, T. J.; LEE, S.-B.; CHAE, G.-T. A POLYMORPHISM IN THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 IS ASSOCIATED WITH IL-12 PRODUCTION FROM MONOCYTE IN LEPROMATOUS LEPROSY. **Cytokine**, v. 20, n. 2, p. 56–62,

out. 2002.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p. 20–30, out. 2001.

KAUFMANN, S. H. E. Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 172–181, abr. 2013.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 816–825, 20 maio 2006.

KAY, E.; SCOTLAND, R. S.; WHITEFORD, J. R. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. **BioFactors**, v. 40, n. 3, p. 284–294, 6 maio 2014.

KHADER, S. A. et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 2, p. 788–95, 15 jul. 2005.

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 369–377, 11 abr. 2007.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79–83, fev. 2008.

KHAN, N. et al. Innate Immunity Holding the Flanks until Reinforced by Adaptive Immunity against Mycobacterium tuberculosis Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–9, 14 mar. 2016.

KHOR, C. C. et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. **Nature Genetics**, v. 39, n. 4, p. 523–528, 25 abr. 2007.

KILLICK, K. E. et al. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 1484–1495, set. 2013.

KIM, T. H.; KUBICA, G. P. Long-term preservation and storage of mycobacteria. **Applied microbiology**, v. 24, n. 3, p. 311–317, 1972.

KIM, T. H.; KUBICA, G. P. Preservation of mycobacteria: 100 percent viability of suspensions stored at -70 C. **Applied microbiology**, v. 25, n. 6, p. 956–60, jun. 1973.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 7, p. 1914–1922, jul. 2009.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1–12, 2011.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 995–1004, jul. 2008.

KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484–487, 26 jul. 2007.

KRIEG, A. M. et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 546–549, 6 abr. 1995.

LAGRANDERIE, M. et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Killed by Extended Freeze-Drying Targets Plasmacytoid Dendritic Cells To Regulate Lung Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 1062–1070, 15 jan. 2010.

LANDE, R. et al. IFN- Released by Mycobacterium tuberculosis-Infected Human Dendritic Cells Induces the Expression of CXCL10: Selective Recruitment of NK and Activated T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1174–1182, 1 fev. 2003.

LANDE, R.; GILLIET, M. Plasmacytoid dendritic cells : key players in the initiation and regulation of immune responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1183, p. 89–103, 2010.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 17 jan. 2005.

LAROSA, D. F. et al. CpG DNA inhibits CD4+CD25+ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4+ T cells. **Immunology Letters**, v. 108, n. 2, p. 183–188, fev. 2007.

LEE, J. et al. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin infection in the CNS suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis and Th17 responses in an IFN-gamma-independent manner. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 9, p. 6201–12, 1 nov. 2008.

LEWINSOHN, D. M. et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 111–115, 15 jan. 2017.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 468–476, abr. 2008.

LIANG, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2271–2279, 2 out. 2006.

LIEBESCHUETZ, S. et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T cell-based assay: a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 364, n. 9452, p. 2196–2203, dez. 2004.

LIN, Y. et al. Interleukin-17 Is Required for T Helper 1 Cell Immunity and Host Resistance to the Intracellular Pathogen Francisella tularensis. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 799–810, nov. 2009.

LIPWORTH, S. et al. Defining dormancy in mycobacterial disease. **Tuberculosis**, v. 99, p. 131–142, jul. 2016.

LIU, C. H.; LIU, H.; GE, B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 12, p. 963–975, 11 dez. 2017.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1701–1711, 10 jul. 2006.

MACFARLANE, D. E.; MANZEL, L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 3, p. 1122–31, 1 fev. 1998.

MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Immunology**, v. 94, p. 5243–5248, 1997.

MAJLESSI, L. et al. An Increase in Antimycobacterial Th1-Cell Responses by Prime-Boost Protocols of Immunization Does Not Enhance Protection against Tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2128–2137, 1 abr. 2006.

MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 641–649, 4 jun. 2008.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 11 maio 2006.

MARIN, N. D. et al. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN- γ and IL-17 in active and latent tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 90, n. 4, p. 252–261, 2010.

MARKOWITZ, N. Incidence of Tuberculosis in the United States among HIV-Infected Persons. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, n. 2, p. 123, 15 jan. 1997.

MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 823–835, nov. 2006.

MCALEER, J. P.; KOLLS, J. K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate

pulmonary immune defense. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 129–144, jul. 2014.

MCCLEAN, C. M.; TOBIN, D. M. Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 7, p. ftw068, out. 2016.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445–453, abr. 2008.

MEANS, T. K. et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 7, p. 3920–7, 1 out. 1999.

MEANS, T. K. et al. Differential Effects of a Toll-Like Receptor Antagonist on Mycobacterium tuberculosis-Induced Macrophage Responses. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4074–4082, 15 mar. 2001.

MEDZHITOV, R. TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. November, p. 135–145, 2001.

MEDZHITOV, R. TLR-mediated innate immune recognition. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 1–2, fev. 2007.

MORTAZ, E. et al. Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor. **European Respiratory Journal**, v. 36, n. 5, p. 1143–1154, 1 nov. 2010.

MORTAZ, E. et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 14 jan. 2015.

MUKAMOLOVA, G. V. et al. Resuscitation-promoting Factors Reveal an Occult Population of Tubercle Bacilli in Sputum. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 2, p. 174–180, 15 jan. 2010.

NAFADY-HEGO, H. et al. Utility of CD127 combined with FOXP3 for identification of operational tolerance after liver transplantation. **Transplant Immunology**, v.

36, p. 1–8, maio 2016.

NAGASE, H. et al. ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. **International Journal of Cancer**, v. 140(3), n. 1, p. 686–695, 2017.

NAJMI, N. et al. Human Toll-like receptor 4 polymorphisms TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile influence susceptibility and severity of pulmonary tuberculosis in the Asian Indian population. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 2, p. 102–109, abr. 2010.

NEYROLLES, O. et al. Is Adipose Tissue a Place for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence? **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, p. e43, 20 dez. 2006.

NISTALA, K. et al. Interleukin-17–producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 3, p. 875–887, mar. 2008.

NORTH, R. J.; JUNG, Y.-J. IMMUNITY TO TUBERCULOSIS. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 599–623, abr. 2004.

O'LEARY, S.; O'SULLIVAN, M. P.; KEANE, J. IL-10 Blocks Phagosome Maturation in *Mycobacterium tuberculosis*– Infected Human Macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 172–180, jul. 2011.

OGATA, M. et al. Plasmacytoid dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming. **International Immunology**, v. 25, n. 3, p. 171–182, 2012.

ORDWAY, D. J. et al. [Increased IL-4 production in response to virulent *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients with advanced disease]. **Acta medica portuguesa**, v. 18, n. 1, p. 27–36, 2014.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454–467, abr. 2008.

OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the

innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13766–13771, 5 dez. 2000.

PAI, M. et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–20, 1 jan. 2014.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 27 out. 2016.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2 nov. 2005.

PARKER, L. C.; PRINCE, L. R.; SABROE, I. Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 147, 2007.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1033–1036, 14 fev. 2003.

PENG, G. et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5739, p. 1380–1384, 2005.

POLTORAK, A. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 11 dez. 1998.

POMPEI, L. et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 8, p. 5192–9, 15 abr. 2007.

QUESNIAUX, V. et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 10, p. 946–959, ago. 2004.

REILING, N. et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with Mycobacterium

tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3480–3484, 1 out. 2002.

REMOLI, M. E. et al. Bystander inhibition of dendritic cell differentiation by Mycobacterium tuberculosis-induced IL-10. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 3, p. 437–446, 31 mar. 2011.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. A role for CD 4 + CD 25 + T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 144, p. 25–34, 2006.

ROJAS, R. E. et al. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis by interleukin-10 and transforming growth factor beta. **Infection and immunity**, v. 67, n. 12, p. 6461–72, dez. 1999.

ROOK, G. A W.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. Opinion: Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 661–667, ago. 2005.

RUSCETTI, F. et al. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 685, p. 488–500, 23 jun. 1993.

RUTZ, M. et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 9, p. 2541–2550, set. 2004.

SAIGA, H. et al. Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. **International Immunology**, v. 24, n. 10, p. 637–644, 1 out. 2012.

SAKAGUCHI, S. NATURALLY ARISING CD4+ REGULATORY TCELLS FOR IMMUNOLOGIC SELF-TOLERANCE ANDNEGATIVE CONTROL OF IMMUNE RESPONSES. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 531–562, abr. 2004.

SAKHNO, L. V. et al. Impairments of Antigen-Presenting Cells in Pulmonary

Tuberculosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

SÁNCHEZ, A. et al. The 19 kDa Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein (LpqH) Induces Macrophage Apoptosis through Extrinsic and Intrinsic Pathways: A Role for the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

SÁNCHEZ, M. D. et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2492–2500, 2006.

SCHWARTZ, D. A et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature Genetics**, v. 25, n. 2, p. 187–191, 1 jun. 2000.

SCOTT-BROWNE, J. P. et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 9, p. 2159–2169, 3 set. 2007.

SCRIBA, T. J. et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1962–70, 1 fev. 2008.

SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1693–1700, 10 jul. 2006.

SHAFIANI, S. et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 7, p. 1409–1420, 5 jul. 2010.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–82, 7 jun. 1999.

SLIGHT, S. R.; KHADER, S. A. Chemokines shape the immune responses to tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 2, p. 105–113, abr.

2013.

SULLIVAN, Z. A. et al. Latent and Active Tuberculosis Infection Increase Immune Activation in Individuals Co-Infected with HIV. **EBioMedicine**, v. 2, n. 4, p. 334–340, abr. 2015.

SUTMULLER, R. P. M. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 485–494, 19 jan. 2006.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.

THUONG, N. T. T. et al. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 5, p. 422–428, 7 jul. 2007.

TIWARI, B.; RAMAKRISHNAN, U. M.; RAGHUNAND, T. R. The *Mycobacterium tuberculosis* protein pair PE9 (Rv1088)-PE10 (Rv1089) forms heterodimers and induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor 4. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 1653–1669, nov. 2015.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–462, dez. 2010.

TORRADO, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 2, p. 66–72, fev. 2011.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179–190, mar. 2007.

TURNER, J. et al. In Vivo IL-10 Production Reactivates Chronic Pulmonary Tuberculosis in C57BL/6 Mice. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6343–6351, 1 dez. 2002.

URRY, Z. et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10–secreting Tregs by

1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. **Journal of Clinical Investigation**, 12 jan. 2009.

VAN BEELEN, A. J. et al. Stimulation of the Intracellular Bacterial Sensor NOD2 Programs Dendritic Cells to Promote Interleukin-17 Production in Human Memory T Cells. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 660–669, out. 2007.

VEATCH, A. V.; KAUSHAL, D. Opening Pandora's Box: Mechanisms of Mycobacterium tuberculosis Resuscitation. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 145–157, fev. 2018.

VELDHOEN, M. et al. TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179–189, fev. 2006.

VELEZ, D. R. et al. Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans. **Human Genetics**, v. 127, n. 1, p. 65–73, 22 jan. 2010.

VOLLMER, J.; KRIEG, A. M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 3, p. 195–204, 2009.

WAIBLER, Z. et al. Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN- α responses by pDC. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 3127–3137, 2008.

WALLIS, R. S. et al. A Whole Blood Bactericidal Assay for Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 8, p. 1300–1303, 15 abr. 2001.

WERGELAND, I.; ASSMUS, J.; DYRHOL-RIISE, A. M. T Regulatory Cells and Immune Activation in Mycobacterium tuberculosis Infection and the Effect of Preventive Therapy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 3, p. 234–242, mar. 2011.

WONG, K. L. et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 41–57, 20 set. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on the management of latent tuberculosis infection**. Genebra: [s.n.]. Disponível em: <www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html>. Acesso em: 6 abr. 2017.

WU, S. et al. Evaluation of TLR2 , TLR4 , and TOLLIP polymorphisms for their role in tuberculosis susceptibility. **APMIS**, v. 126, n. 6, p. 501–508, jun. 2018.

XIN, L. et al. Systemic Treatment with CpG-B after Sublethal Rickettsial Infection Induces Mouse Death through. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

XUE, Y. et al. Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a southeastern Chinese population with tuberculosis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, n. 2, p. 135–138, abr. 2010.

YANG, L. et al. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human TH17 cells. **Nature**, v. 454, n. 7202, p. 350–352, 17 jul. 2008.

YAO, Z. et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity**, v. 3, n. 6, p. 811–821, dez. 1995.

ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J. Cytokines Response to Microbes, Their Products, and Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Receptors and Differential Regulation of Tissue Expression of Human Toll-Like Tissue Expression of Human Toll-Like Receptors and Differential Regulation of Toll-Like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. **J Immunol References**, v. 168, p. 554–561, 2002.

ZENNER, D. et al. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 167, n. 4, p. 248, 15 ago. 2017.

ZHANG, Y. et al. Toll-Like Receptor -1, -2, and -6 Polymorphisms and Pulmonary Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63357, 14 maio 2013.

ZHOU, L. et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 236–240, 8 maio 2008.

ZHU, H. et al. CD16⁺ monocyte subset was enriched and functionally exacerbated in driving T-cell activation and B-cell response in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. NOV, p. 1–15, 2016.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, mar. 2010.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 3, p. 584–92, 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74–e80, 21 out. 2010.

ZUÑIGA, J. et al. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–18, 2012.

ANEXOS

Aprovação do Parecer Consubstanciado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES DO TIPO TOLL NA MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DE CÉLULAS REGULADORAS E SEU IMPACTO NA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS SADIOS (REATIVOS OU NÃO AO TESTE TUBERCULÍNICO) E NA TUBERCULOSE PULMONAR

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04342812.0.0000.5060

Pesquisador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Instituição: Centro de Ciências da Saúde (CCS-UFES)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 85575

Data da Relatoria: 29/08/2012

Apresentação do Projeto:

Estudo descritivo, longitudinal, para avaliação do papel de receptores do tipo Toll na frequência de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺) e influência na proliferação do *Mycobacterium tuberculosis* em culturas de sangue total e de PBMCs. O estudo será conduzido nos laboratórios de Micobacteriologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. O sangue e as células do PBMC serão adquiridos de indivíduos PPD +, PPD- e pacientes com tuberculose ainda sem tratamento, tratados, curados e com recidiva. Estas serão infectadas com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o papel de receptores do tipo Toll (TLRs) na formação, frequência e atividade de células de T reguladoras, correlacionando-o com a resposta imune em pacientes com tuberculose pulmonar e em indivíduos sadios reativos ou não ao teste tuberculínico (PPD+ e PPD-).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: acidentes relacionados a coleta e manejo de material biológico.
Benefícios: aprimorar o conhecimento acerca da resposta imunológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

presentes e adequados.

Recomendações:

não há.

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Os membros aprovaram o parecer do relator.

VITÓRIA, 30 de Agosto de 2012

Assinado por:
Adauto Emmerich Oliveira

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: S/N
UF: ES
Município: VITÓRIA
Telefone: (27)3335-7211
CEP: 29.040-091
E-mail: cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

Quadro 1: Critérios para a positividade de TST, por grupo de riscos.

Reação ≥ 5 mm de enduração	Reação ≥ 10 mm de enduração	Reação ≥ 15 mm de enduração
<p>Pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)</p> <p>Contatos recentes de pacientes com TB</p> <p>Alterações fibróticas no rx de tórax compatíveis com TB prévia</p> <p>Os doentes com transplantes de órgãos e outros doentes imunossuprimidos (que receberam o equivalente a 15 mg / dia de prednisona durante 1 mês ou mais) *</p> <p>Assintomáticos adultos e adolescentes (> 10 anos)**</p> <p>Crianças não vacinadas com BCG, crianças vacinadas há mais de dois anos ou qualquer condição imunossupressora**</p>	<p>Imigrantes recentes (últimos 5 anos) de países com alta prevalência</p> <p>Usuários de drogas injetáveis</p> <p>Residentes e empregados dos seguintes contextos de alto risco: prisões, instituições para idosos, hospitais e outros estabelecimentos de saúde, instalações residenciais para pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e abrigos de sem-teto</p> <p>Profissional de laboratório de micobacteriologia</p> <p>Pessoas com as seguintes condições clínicas que as colocam em alto risco: silicose, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, alguns distúrbios hematológicos peso perda de $\geq 10\%$ do peso corporal ideal, gastrectomia e bypass jejunoileal</p> <p>Crianças menores de 4 anos de idade, crianças e adolescentes expostos a adultos de alto risco</p> <p>Crianças vacinadas com BCG há menos de dois anos**</p>	<p>Pessoas sem fatores de risco para TB</p> <p>Conversão**</p> <p>Contatos de TB bacilífera</p> <p>Profissional de saúde</p> <p>Profissional de laboratório de micobactéria</p> <p>Trabalhador de sistema prisional</p> <p>Trabalhador de sistema prisional</p> <p>Trabalhadores de instituições de longa permanência</p>
<p>* O risco de TB em doentes tratados com corticosteróides aumenta com uma dose mais elevada e uma duração mais prolongada. † Para as pessoas que de outra forma estão em baixo risco e são testadas no início do emprego, uma reação ≥ 15 mm de enduração é considerada positiva.</p> <p>** (BRASIL, 2011). Adaptado de (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000) (BRASIL, 2011)</p>		

Quadro 2: Anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de células T reguladoras e monócitos/macrófagos

Anticorpo Monoclonal	Isotipo	Clone	Concentração	Expressão/Função
CD25 FITC <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG ₁ , κ	M-A251	_____	Reage com CD25 a glicoproteína de 55 kDa, conhecida como receptor de interleucina-2 de baixa afinidade (IL-2R). O CD25 é expresso em linfócitos (T e B) e monócitos, e associa-se com a cadeia de receptores p75 de alta afinidade para formar o complexo de IL-2R.
FoxP3 PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG ₁	259D/C7	_____	A expressão de FoxP3, também conhecida como Scurfin, IPEX e JM2, foi associada a células T reguladoras CD4+ e representa um marcador específico para estas células.
CD4 PECy5 <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG ₁ , κ	RPA-T4	_____	O clone RPA-T4 reage com CD4, uma glicoproteína transmembrana de cadeia única de 59 kDa presente em populações de células T auxiliares / indutores. Este anticorpo liga-se ao domínio D1 (epítomos CDR1 e CDR3) do antígeno CD4 e reage com aproximadamente 80% de timócitos e 45% de linfócitos do sangue periférico. CD4 também está presente em baixa densidade em monócitos do sangue periférico.
CD14 FITC <i>eBioscience</i>	Mouse IgG1, κ	61D3	50 µg/ml	Glicoproteína expressa em monócitos, macrófagos interfoliculares e algumas células dendríticas. Liga-se com alta afinidade a LPS e LBP em monócitos.
CD16 (FcγRIII) PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG1	eBIOCB16(CB16)	0,3 µg/ml	Receptor de baixa afinidade para IgG, ligando-se na forma de imunocomplexo. Macrófagos, células NK e neutrófilos expressam este receptor.
CD11c PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG1, κ	3.9	50 µg/ml	Está associada a β2 integrina para formar o heterodímero CD11c/CD18. Este complexo é expresso em monócitos, granulócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas e subgrupos de células T e B. CD11c/CD18 liga-se a CD54, IC3b e fibrinogênio, mostrando um papel na adesão de leucócitos.
TLR2 PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	TL2.1	50 µg/ml	Receptor de reconhecimento padrão que sinaliza em resposta a lipoproteínas bacterianas. Atuam na imunidade inata e na inflamação. É expresso por monócitos do sangue periférico.
TLR4 PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	HTA125	50 µg/ml	Como TLR2, TLR4 também responde a lipoproteínas bacterianas. Este receptor de reconhecimento padrão associa-se com a molécula MD-2, e junto com CD14, reconhecem LPS e sinalizam. Também é expresso por monócitos do sangue periférico.
TLR9 PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	eB72-1665	0,2mg/ml	Molécula intracelular, que medeia resposta a dinucleotídeos CpG não-metilados do DNA bacteriano. É expresso por células dendríticas plasmacitoides e linhagem de células epiteliais humana.
HLA-DR PE Cy5 <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2b, κ	LN3	0,75 µg/ml	Proteína transmembrana heterodimérica importante na apresentação de peptídeos a linfócitos T CD4+. É expressa na superfície de células apresentadoras de antígenos incluindo células B, monócitos, macrófagos e DC.
CD123 PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG1, κ	6H6	6,25 µg/ml	CD123 é a cadeia α do receptor de IL-3. Esta cadeia liga-se com baixa afinidade a IL-3, mas quando associada à cadeia β (CD131), a ligação do receptor (cadeias α e β) a IL-3 é de alta afinidade. CD123 é expresso por precursores mielóides, macrófagos, DC, mastócitos, basófilos e megacariócitos.
CD209 PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG2b, κ	DCN46	_____	DC-SIGN ou CD209 é expressa por células dendríticas. Sua interação com ICAM-3 e/ou ICAM-2 promove a migração destas células.
CD40 PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG1, κ	5C3	_____	Molécula coestimulatória presente no sangue periférico e tonsilas B. Também está presente em algumas células epiteliais, carcinomas e células dendríticas linfóides.
CD86 (B70/B7-2) PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG1, κ	2331 (FUN-1)	_____	CD86 é o ligante secundário de CD28 e CTLA-4, mostrando papel importante na coestimulação de linfócitos T na resposta imune primária. É expresso por monócitos e células B ativadas.
Mouse IgG1, κ FITC isotype control <i>eBioscience</i>	Mouse IgG1, κ	_____	50 µg/ml	Controle isotípico
Mouse IgG2b PECy5 isotype control <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2b, κ	_____	1,5 µg/ml	Controle isotípico
Mouse IgG2a PE isotype control <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	_____	12,5 µg/ml	Controle isotípico

Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) e PE-Cy5 (antigo Cy-Chrome™) é um sistema conjugado que combina R-phycoerythrin e um corante cianina (de 1.5 kDa; Cy5).

Folha de submissão do artigo

06/06/2018

ScholarOne Manuscripts



The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease

Home

Author

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease

Manuscript ID

IJTLD-06-18-0392

Title

Toll-like receptors blocking restores in-vitro microbicidal activity in latent tuberculosis infected subjects.

Authors

Coelho da Silva, Flávia

Covre, Luciana

Stringari, Lorenzo

Palaci, Moisés

Dietze, Reynaldo

Gomes, Daniel

Rodrigues, Rodrigo

Date Submitted

06-Jun-2018

Author Dashboard

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças à Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)